

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CENTRO POLITÉCNICO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Expressão gênica diferencial em ostras *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico

IGOR DIAS MEDEIROS

Curitiba – 2008

# PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia

Setor de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Paraná

Instituto de Biologia Molecular do Paraná

## PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

  
**Dr. Afonso Celso Dias Bainy**

Orientador da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

  
**Dr. Marcos Luiz Pessatti**

Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI

  
**Dr.ª Helena Cristina da Silva de Assis**

Universidade Federal do Paraná - UFPR

  
**Dr. Stenio Perdígão Fragoso**

Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP

  
**Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro**

Universidade Federal do Paraná - UFPR

e tendo como suplente,

**Dr.ª. Carolina Arruda de Oliveira Freire**

Universidade Federal do Paraná - UFPR

após argüir o(a) doutorando(a) **Igor Dias Medeiros** em relação ao seu trabalho de tese intitulada: "**Expressão gênica diferencial em ostras expostas a esgoto doméstico**", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, dentro da área de concentração em **Biologia Celular e Molecular**.

A obtenção do título de Doutor está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

Curitiba, 25 de setembro de 2008

  
**Silvio Sanches Veiga**  
Coordenador do Curso

IGOR DIAS MEDEIROS

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM OSTRAS *Crassostrea gigas*  
EXPOSTAS A ESGOTO DOMÉSTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Afonso Celso Dias Bainy, Dr.

CURITIBA

2008

À Simone, Natan e Matias,  
pra sempre galera!



## Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a realização desse trabalho, em especial:

- ao Afonso, pela oportunidade, amizade e confiança depositada em mais essa parceria. Muito obrigado pela orientação, mas principalmente, pelo exemplo!
- aos colegas de projeto, que tornaram possível a realização de cada uma das etapas desta tese: Guilherme, Marília, Dani, Juliano, Fabrício, Nina e Thiago;
- ao demais companheiros do lab, em especial à Isabel, Juliana e Taíse, pela iniciação em biomol, e também à Riso, Jacó, Karin, Ana Paula, Talita, Daniela, por estarem sempre presentes. Aqui entra também o Alcir, Jeff e Trevisan, afinal é um grupo só;
- ao pessoal do LMM, em especial ao Jaime, Cláudio e ao Jackson, pelo fornecimento das ostras e todo o suporte nos experimentos de exposição em aquários;
- à Escola do Mar do município de São José, SC, pelo suporte nos experimentos de campo;
- à CASAN, pelo apoio na coleta e análise do esgoto, em especial ao Jairzinho, Vanessa, Terezinha e Edmar;
- ao Lab de QMC do IO-USP, Sílvio, Márcia, Satie e Rosalinda, pelas análises químicas;
- ao prof. Milton Ozório Moraes da FIOCRUZ, pela ajuda com o seqüenciamento das amostras;
- aos professores, colegas e funcionários da pgbiocel, em especial profa. Carolina e prof. Ciro, à Marlene e entre os colegas a Ana, Grazy, Henrique, Rodrigo, Ticyana, Samanta, Fabíola, Alberto e Marcus. Abração especial pro João Gabriel e pro Ciro Criminácio, esse é parceiro!!!
- ao pessoal do IBMP por todo o apoio, dedicação e convivência durante os cursos de Biomol e de Genômica. Certamente não lembrarei de todos os nomes, mas sintam-se agradecidos. Em especial vai meu abraço ao Stênio, ao Marco e a Didi, vocês são sensacionais;
- ao CNPq pelos projetos que deram suporte a essa tese;

- aos professores que compõem a banca, que se dispuseram a avaliar esse trabalho bem como a apresentação, obrigado pelas sugestões e críticas, Helena, Carolina, Stênio, Ciro e Pessati, muito obrigado;
- à Cristina, ao Ciro (de novo) e ao Adriano, pela hospedagem durante as disciplinas;
- a toda galera do grupo Roda Livre, pelas rodas de capoeira na Vila Verde, em especial ao Mestrando Mineiro e ao instrutor Dênis, *pé dentro pé fora...*
- à Ingrid e demais colegas que seguraram legal as minhas aulas em Floripa e Tubarão durante as disciplinas obrigatórias em Curitiba;
- a minha grande família Salles, pelo suporte e auxílio durante esse período;
- a meu pai, minha mãe e meus irmãos, por me permitirem chegar até aqui com condições de definir;
  
- à BR 101, pelos momentos de reflexão;
  
- a minha parceira Simone, que segurou legal a onda em Floripa várias vezes, com duas crianças e sem carro para que eu ficasse de bacana estudando em Curitiba, e aos meus filhos Natan e Matias, para quem eu dedico todo esse trabalho realizado, sem vocês teria sido muito mais difícil! Eu amo vocês três e espero que sejam tão felizes quanto eu sou por estar ao seu lado, obrigado!

## Sumário

	Pg.
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1     Introdução.....	1
2     Objetivos.....	10
3     Material e Métodos.....	11
3.1   Ostra <i>Crassostrea gigas</i> .....	11
3.2   Exposição ao esgoto doméstico.....	11
3.2.1 Coleta e aclimação das ostras.....	11
3.2.2 Coleta do esgoto.....	12
3.2.3 Exposição nos aquários.....	13
3.2.4 Exposição a locais contaminados por esgoto doméstico.....	14
3.3   Análises químicas.....	17
3.4   Análises moleculares.....	19
3.4.1 Preparo da amostra.....	19
3.4.2 Identificação dos genes diferencialmente expressos.....	20
3.4.2.1     Extração RNA total.....	20
3.4.2.2     Purificação do RNA mensageiro.....	21
3.4.2.3     Hibridização subtrativa supressiva.....	21
3.4.2.4     Clonagem dos fragment. de cDNA diferencialm. expressos.....	24
3.4.2.5     Purificação do plasmídeo.....	24

3.4.2.6	Sequenciamento.....	24
3.4.2.7	Análise das sequências.....	25
3.4.3	Análise dos genes diferencialmente expressos na exposição ao esgoto em aquários.....	25
3.4.3.1	Extração do RNA total das brânquias de ostras.....	25
3.4.3.2	Síntese de cDNA das brânquias de ostras.....	25
3.4.3.3	Desenho dos iniciadores de DNA.....	25
3.4.3.4	Padronização das condições de PCR.....	27
3.4.3.5	Análise da expressão gênica RT-PCR semi-quantitativo.....	28
3.4.3.6	Eletroforese em gel de agarose.....	29
3.4.3.7	Densitometria.....	29
3.4.4	Análise dos genes diferencialmente expressos na exposição ao esgoto no ambiente.....	29
3.4.5	Análise Estatística dos dados.....	29
4	Resultados.....	31
4.1	Índice de Condição das ostras.....	31
4.2	Análise do esgoto.....	32
4.3	Fatores Abióticos e Análises Químicas.....	32
4.4	Identificação dos genes diferencialmente expressos.....	35
4.5	Análise da expressão gênica diferencial em aquários.....	39
4.6	Análise da expressão gênica diferencial <i>in situ</i> .....	42
5	Discussão.....	48
5.1	Fatores Abióticos e Análises Químicas.....	48
5.2	Análise da expressão gênica diferencial.....	55
6	Conclusões.....	68
7	Referências Bibliográficas .....	69
8	Anexos.....	80

8.1 Anexo I: Medeiros, I.D.; Siebert, M.N.; Toledo-Silva, G.; Moraes, M.O.; Marques, M.R.F & Bainy, A.C.D. "Differential gene expression in oyster exposed to sewage". Marine environmental Research – doi: 10.1016/j.marenvres.2008.02.048.....	80
8.2 Anexo II: Medeiros, I.D.; Siebert, M.N.; Toledo-Silva, G.; Rodrigues, T.B.; Marques, M.R.F & Bainy, A.C.D. "Induced gene expression in oyster <i>Crassostrea gigas</i> exposed to sewage". Environmental Toxicology and Pharmacology - doi:10.1016/j.etap.2008.05.004.....	86
8.3 Anexo III: Toledo-Silva, G.; Siebert, M.N.; Medeiros, I.D.; Sincero, T.C.M.; Moraes, M.O.; Goldstone, J.V. & Bainy, A.C.D. "Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster <i>Crassostrea gigas</i> ". Marine environmental Research - doi: 10.1016/j.marenvres.2008.02.010.....	90
8.4 Anexo IV: Zanette, J.; Nunes, F.F.; Medeiros, I.D.; Siebert, M.N.; Matos, J.J.; Lückmann, K.H.; Melo, C.M.R. & Bainy, A.C.D. "Comparison of the antioxidant defense system in <i>Crassostrea rhizophorae</i> and <i>Crassostrea gigas</i> exposed to domestic sewage discharges". Marine environmental Research - doi: 10.1016/j.marenvres.2008.02.057.....	99
8.5 Anexo V: Dafré, A.L.; Medeiros, I.D.; Müller, I.C.; Ventura, E.C. & Bainy, A.C.D. "Antioxidant enzymes and thiol/disulfide status in the digestive gland of the brown mussel <i>Perna perna</i> exposed to lead and paraquat". Chemico-Biological Interactions 149, 97 – 105. 2004.....	107

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> coleta do esgoto doméstico não tratado pelos técnicos em saneamento da Companhia Catarinense de Água e Saneamento.....	<b>13</b>
<b>Figura 2:</b> exposição das ostras <i>Crassostrea gigas</i> a 33% de esgoto doméstico não tratado por 48h em aquários.....	<b>14</b>
<b>Figura 3:</b> estrutura flutuante de PVC para exposição das ostras aos locais contaminados por esgoto doméstico.....	<b>15</b>
<b>Figura 4:</b> vista parcial da Baía Norte da Ilha de Santa Catarina com os locais de exposição do experimento <i>in situ</i> .....	<b>17</b>
<b>Figura 5:</b> ostra <i>Crassostrea gigas</i> com destaque para glândula digestiva, gônadas, manto e brânquias.....	<b>20</b>
<b>Figura 6:</b> esquema ilustrativo da hibridização subtrativa supressiva.....	<b>23</b>
<b>Figura 7:</b> índice de condição das ostras utilizadas nos experimentos de exposição ao esgoto.....	<b>31</b>
<b>Figura 8:</b> parâmetros físicos, químicos e microbiológicos da água dos locais 1, 2, 3 e 4 durante a exposição <i>in situ</i> .....	<b>33</b>
<b>Figura 9:</b> produtos de PCR da hibridização subtrativa supressiva em gel de agarose 2% TAE1x.....	<b>36</b>
<b>Figura 10:</b> placa de Petri com as colônias de células JM109 (Promega) contendo os clones resultantes da hibridização subtrativa supressiva.....	<b>37</b>
<b>Figura 11:</b> padronização do número de ciclos das reações de RT-PCR para análise da expressão gênica em brânquias de ostras expostas a esgoto em aquários.....	<b>40</b>
<b>Figura 12:</b> expressão dos genes <i>CYP356A1</i> , <i>GSTO</i> , <i>MDR</i> , <i>FABP</i> e <i>ALAS</i> em ostras expostas a 33% de esgoto doméstico não tratado por 48h.....	<b>41</b>
<b>Figura 13:</b> padronização do número de ciclos das reações de RT-PCR em brânquias de ostras expostas a esgoto <i>in situ</i> .....	<b>43</b>
<b>Figura 14:</b> expressão dos genes <i>CYP356A1</i> , <i>GSTO</i> , <i>MDR</i> , <i>FABP</i> e <i>ALAS</i> em brânquias de ostras expostas a locais contaminados por esgoto por 14 dias..	<b>44</b>
<b>Figura 15:</b> padronização do número de ciclos das reações de RT-PCR em glândula digestiva de ostras expostas a esgoto <i>in situ</i> .....	<b>46</b>

**Figura 16:** expressão dos genes *CYP356A1*, *GSTO*, *MDR*, *FABP* e *ALAS* em glândula digestiva de ostras expostas a locais contaminados por esgoto por 14 dias.....**47**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> pares de iniciadores e tamanho esperado dos fragmentos gênicos analisados em brânquias de ostras expostas a esgoto.....	<b>27</b>
<b>Tabela 2:</b> condições das reações de PCR para análise da expressão gênica em brânquias de ostras expostas a esgoto.....	<b>28</b>
<b>Tabela 3:</b> parâmetros químicos e microbiológicos do esgoto doméstico não tratado.....	<b>32</b>
<b>Tabela 4:</b> concentração de contaminantes orgânicos nas amostras de sedimento dos locais de exposição do experimento <i>in situ</i> .....	<b>34</b>
<b>Tabela 5:</b> concentração dos contaminantes orgânicos nas ostras <i>Crassostrea gigas</i> mantidas nos locais de exposição durante o experimento <i>in situ</i> .....	<b>35</b>
<b>Tabela 6:</b> lista dos genes que tiveram sua expressão induzida pela exposição ao esgoto, identificados pela hibridização subtrativa supressiva.....	<b>38</b>



## RESUMO

O lançamento de esgoto doméstico em águas superficiais é a principal causa de poluição dos ecossistemas aquáticos ao redor do mundo. O esgoto contém contaminantes diversos como produtos de higiene pessoal, limpeza doméstica, medicamentos humanos e veterinários, óleos e graxas, químicos diversos, além de microorganismos patogênicos e nutrientes em excesso. O contato destes compostos com a biota provoca alterações causando dano e ativando os mecanismos de defesa. A análise da expressão de diferentes genes simultaneamente em um organismo exposto à presença de um contaminante pode auxiliar o entendimento dos mecanismos de toxicidade e defesa biológica, além de contribuir como biomarcador de contaminação em programas de monitoramento ambiental. No presente trabalho, após um período de 10 dias de aclimação, ostras adultas da espécie *Crassostrea gigas* (n=10) foram expostas a 33% de esgoto doméstico não tratado por 48h, em aquários de 45L sob condições controladas. Através da técnica de hibridização subtrativa supressiva a expressão diferencial de genes em pool de brânquias de cinco ostras macho foi investigada, sendo obtidos inicialmente 61 clones, dos quais 15 foram identificados. Cinco genes associados a mecanismos de biotransformação de xenobióticos foram escolhidos para confirmação da indução da expressão por RT-PCR semi-quantitativo, normalizado pela expressão do gene da Actina. Esses genes são responsáveis por reações de biotransformação de fase I (*CYP356A1*), fase II (*GSTO*), fase III (*MDR*), transporte de ácidos graxos e compostos hidrofóbicos (*FABP*) e síntese do grupo heme (*ALAS*). Todos os genes apresentaram maiores valores de expressão (1,9, 3,3, 3,3, 43,6 e 2,9x para *CYP356A1*, *GSTO*, *MDR*, *FABP* e *ALAS*, respectivamente) nas ostras expostas ao esgoto quando comparadas ao grupo controle. Para verificar a aplicabilidade da análise em programas de biomonitoramento *in situ*, as ostras foram transplantadas para locais referência e contaminados por esgoto doméstico, assim permanecendo por 14 dias. A análise da expressão gênica em brânquias e glândula digestiva das ostras expostas *in situ* a esgoto doméstico não apresentou diferenças significativas entre os grupos, provavelmente devido ao período de exposição, considerado muito longo para análises moleculares.

## ABSTRACT

The main cause of surface waters contamination around the world is untreated sewage delivery. Sewage contains several kinds of contaminants like personal care and house cleaning products, human and pet medicines, oils and other chemicals besides pathogenic microorganisms and nutrients in excess. The contact of these contaminants with the organisms may cause harm and activate defense mechanisms. The analysis of several genes in the same time in a contaminant stressed organism may contribute to elucidate toxicity and biological defense mechanisms and be useful as a biomarker in environmental monitoring programs. In this work, after a 10 days acclimatation period, adult *crassostrea gigas* oysters (n=5) were exposed to 33% of untreated sewage for 48h, in 45L aquariums under controlled conditions. Differential gene expression in pooled gills of male oysters were investigated through suppressive subtractive hybridization. From the sixty-one clones obtained 15 were identified. Five genes associated with biotransformation of xenobiotics were submitted to semiquantitative RT-PCR normalized with actin to confirm the induction in gene expression by sewage. These genes are responsible for phase I (*CYP356A1*), phase II (*GSTO*) and phase III (*MDR*) of xenobiotics biotransformation, fatty acid and hydrophobic compounds transport (*FABP*) and the heme group synthesis (*ALAS*). All the analysed genes showed higher values of gene expression (1,9, 3,3, 3,3, 43,6 and 2,9x for *CYP356A1*, *GSTO*, *MDR*, *FABP* and *ALAS*, respectively) in sewage exposed oysters compared to control group oysters. To verify the applicability of this kind of analysis in biomonitoring programs, oysters were transplanted to sewage contaminated and reference sites for 14 days. Gene expression analysis in gills and digestive glands of *in situ* sewage exposed oysters did not show significant differences between the groups, probably because the exposition period was too long for molecular analysis.

## 1 Introdução

A contaminação dos ecossistemas pode afetar os animais expostos causando efeitos adversos nos tecidos alvo e organismos como um todo, podendo refletir na alteração da estrutura das populações e comunidades (Pina *et al.*, 2007). As alterações decorrentes da exposição aos contaminantes nos organismos a nível molecular, bioquímico, fisiológico, histológico ou celular são denominadas biomarcadores (Huggett *et al.*, 1992). O uso de biomarcadores em programas ambientais apresenta algumas vantagens sobre as análises químicas, pois são técnicas mais baratas, que indicam biodisponibilidade, expressam os efeitos tóxicos, podem auxiliar na elucidação dos mecanismos de toxicidade dos xenobióticos e podem possibilitar a detecção de um problema mais grave enquanto ainda há tempo para reverter uma situação adversa (Walker *et al.*, 2001).

As características ideais de um biomarcador são especificidade química e biológica, sensibilidade, clareza de interpretação, tempo curto de manifestação e permanência da resposta, associação aos níveis mais elevados de organização biológica e aplicabilidade às condições de campo (Huggett *et al.*, 1992). Além disso, devem permitir a distinção entre a variabilidade natural e o estresse induzido pela contaminação e ter significância toxicológica, ou seja, é desejado que a resposta esteja relacionada ao impacto do contaminante sobre o organismo (Pina *et al.*, 2007).

Dentro dessa perspectiva, vários parâmetros têm sido analisados nos diferentes níveis de organização biológica. As análises fisiológicas representam a interface entre a parte toxicológica e a ecológica, formando a base para as alterações do organismo como um todo, que por sua vez irão refletir nas características das populações (Munkittrick e van der Kraak., 1999). Penã e Pocsidio (2007) observaram redução na taxa de alimentação e crescimento do gastrópode *Pomacea canniculata* após dez dias de exposição a cobre, enquanto Andersen e colaboradores (2006) mostraram que a exposição a longo prazo ao desregulador endócrino etinilestradiol afeta a reprodução de uma espécie de peixe. Ao nível citológico e histológico Castro e colaboradores (2004) encontraram os menores valores de estabilidade lisossomal em

hemócitos de mexilhões de regiões contaminadas com elementos metálicos. Akaishi e colaboradores (2007) observaram aumento da atividade fagocítica, na capacidade de resistir a patógenos e lesões histopatológicas nas brânquias de mexilhões expostos a esgoto doméstico não tratado por 14 dias. A nível bioquímico um aumento na atividade da enzima Glutathione S-transferase e na quantidade de citocromo P450 foi registrado em mexilhões expostos a diclorofenol (Petushok *et al.*, 2002) e Almeida e colaboradores (2003) detectaram uma redução nos níveis de serotonina e dopamina em mexilhões expostos a chumbo e cádmio.

Enquanto as análises bioquímicas historicamente tem sido realizadas através da atividade enzimática ou dos níveis de proteína, o desenvolvimento da biologia molecular criou condições para o surgimento de um novo grupo de biomarcadores, baseados na análise da transcrição de genes relacionados ao estresse, os chamados biomarcadores de expressão gênica (Pina *et al.*, 2007).

De um modo geral, a presença de um contaminante atua como um efector que ativa um sensor ou receptor celular, que por sua vez interage com uma sequência específica de DNA no núcleo promovendo a transcrição de algum gene. O produto da transcrição é o RNA mensageiro (RNAm), que é processado e enviado ao citoplasma para que o ribossomo sintetize a proteína correspondente. A proteína, por sua vez, constitui a base molecular da resposta biológica à presença do efector (Pina *et al.*, 2007). Assim a expressão gênica representa o primeiro nível de interação entre um agente estressor e o genoma, que, através da síntese de proteínas dirige a resposta do organismo às mudanças externas (Brulle *et al.*, 2008). Embora essa norma possa apresentar algumas variações, a quantidade de proteína sintetizada costuma refletir a quantidade de RNAm, que por sua vez depende da indução da transcrição por um receptor que foi ativado pela presença de um efector em concentração suficiente.

Dessa forma a análise da expressão gênica permite diagnosticar a existência de estresse em uma população e analisar esta resposta ao estresse além de contribuir para a elucidação dos mecanismos de regulação da expressão destes genes em resposta a doenças e estímulos ambientais (Ju *et al.*, 2006; Brulle *et al.*, 2008). Finne e colaboradores (2007) afirmaram que

através do perfil de expressão gênica pode-se monitorar vários biomarcadores clássicos simultaneamente além de ser possível identificar outros novos.

De acordo com Maggioli e colaboradores (2006) um crescente número de estudos tem demonstrado que a expressão diferencial de genes pode ser utilizada na análise toxicológica preditiva, auxiliando na identificação da classe de toxicidade de determinado composto. Essa abordagem toxicogenômica pode ajudar a reduzir custos e acelerar os processos de testes de novas drogas, pois alterações na expressão dos genes mediadas por toxinas podem ser detectadas antes que a química clínica, histopatologia ou observações clínicas possam sugerir um efeito tóxico.

As ferramentas genômicas estão sendo empregadas também na análise ecotoxicológica, onde tem por objetivo esclarecer os efeitos moleculares e celulares dos contaminantes através das alterações na expressão gênica dos organismos. Esse ramo da ciência, chamado de ecotoxicogenômica, tem crescido substancialmente nos últimos anos, principalmente devido aos esforços de seqüenciamento do genoma de algumas espécies de peixe como *Danio rerio* e *Oryzias latipes* (Hoffmann *et al.*, 2006). A decodificação completa do genoma de vários animais seguida da identificação de todos os transcritos e proteínas correspondentes, deverá proporcionar o entendimento de como a expressão dos genes está relacionada com seu *status* fisiológico e patológico (Chatterjee-Kishore e Whitley, 2004). O sequenciamento completo do genoma de um organismo permite o conhecimento detalhado de sua biologia e constitui uma poderosa ferramenta de análise para os pesquisadores (Saavedra & Bachère, 2006). Entretanto a genômica dispõe de várias outras abordagens que permitem analisar o comportamento de múltiplos genes em situações específicas.

Dentre as ferramentas empregadas na análise genômica as hibridizações com oligonucleotídeos ou cDNA – (*arrays* -micro e macro) são muito utilizadas quando se tem conhecimento do genoma do organismo. Os *microarrays* são basicamente uma lâmina de vidro de microscopia onde milhares de oligonucleotídeos são impressos em um sistema cartesiano (em forma de grade). DNA ou RNAm de duas diferentes populações de células são marcados com material fluorescente e hibridizados com o DNA impresso na

lâmina. A imagem dos pontos fluorescentes é então digitalizada para análise quantitativa da fluorescência. Através da análise dos *arrays* é possível descobrir quais genes foram induzidos ou reprimidos em uma determinada população de células comparada à outra (François *et al.*, 2003). Dessa forma os *arrays* comparam, por exemplo, a abundância relativa de RNAm hibridizado a certo cDNA de duas amostras em um clone impresso na lâmina (Hsu *et al.*, 2006). A principal vantagem dos *arrays* é fornecer uma “fotografia” da atividade transcricional de milhares de genes simultaneamente (François *et al.*, 2003). Por outro lado um fator que tem limitado sua utilização é a pequena disponibilidade de genomas seqüenciados, principalmente quando não se trata de um organismo modelo. Hoffmann e colaboradores (2006) aplicaram o método para analisar a interferência de desreguladores endócrinos sobre a expressão gênica em peixes e encontraram um grupo de genes sob forte influência, porém com identidade desconhecida. Outro fator limitante é o custo dessa tecnologia, que ainda é alto e normalmente torna as repetições muito caras, reduzindo a quantidade de dados disponíveis (Lettieri *et al.*, 2006).

Já nos chamados sistemas abertos (quando não se tem conhecimento prévio do genoma do organismo) as técnicas mais comumente utilizadas são o *differential display* e a hibridização supressiva subtrativa (Bultelle *et al.*, 2002). A estratégia geral utilizada na técnica de *differential display* é isolar duas populações de RNAm, sintetizar o cDNA a partir de cada uma delas e analisar o resultado em eletroforese. A partir da comparação direta dos géis, os fragmentos diferencialmente expressos são reamplificados e clonados para estudos posteriores. Liao e Freedman (2002) destacam que as vantagens desta técnica são a pequena quantidade de material inicial, simplicidade e sensibilidade do método, comparação lado a lado de várias amostras e rápida identificação e confirmação dos resultados. Por outro lado essa técnica apresenta muitos resultados falso-positivos, que teriam que ser eliminados aumentando o número de repetições ou complementando o método com alguma forma de hibridização de ácidos nucleicos (Bultelle *et al.*, 2002).

A hibridização subtrativa supressiva é caracterizada por amplificar exponencialmente os transcritos diferencialmente expressos em um PCR supressivo, após realizar dupla subtração dos transcritos comuns a duas

populações de cDNA (Figura 6). Em um primeiro momento duas populações de RNAm são reversamente transcritas a cDNA. Uma das populações de cDNA é denominada *driver*, enquanto a outra, que se quer investigar, é chamada *tester*. A amostra *tester* é subdividida em duas e cada uma delas recebe um oligonucleotídeo adaptador diferente na extremidade 5'. Cada subpopulação do *tester* é então submetida à hibridização em separado com o *driver*. Os fragmentos gênicos comuns formarão moléculas híbridas enquanto os fragmentos diferencialmente expressos contendo o adaptador não hibridizam. As duas amostras são então misturadas e uma nova quantidade de cDNA *driver* é adicionado para uma segunda hibridização, porém sem desnaturação. Nesse momento os fragmentos diferencialmente expressos contendo os diferentes adaptadores hibridizam. O produto desta hibridização é submetido a um PCR supressivo em que apenas os genes presentes na amostra *tester* são amplificados (Figura 6). Nessa reação de PCR os adaptadores desenvolvidos pela Clontech no kit PCR Select cDNA Subtraction favorecem a amplificação dos transcritos diferencialmente expressos enquanto a amplificação inespecífica é suprimida.

Esse método foi utilizado para identificar genes que possam estar envolvidos na defesa contra microorganismos em camarões (He *et al.*, 2004), tolerância a temperatura em ostras (Huvet *et al.*, 2004), exposição a contaminantes em peixes (Baldwin *et al.*, 2005) e outras situações de estresse em diferentes organismos. He e colaboradores (2004) afirmam que a hibridização subtrativa supressiva é um dos métodos mais poderosos para identificação de genes diferencialmente expressos. Investigando a resposta de hemócitos de camarões à contaminação microbiana eles identificaram 25 genes de relevância imunológica, dos quais cinco, escolhidos para confirmação do resultado, tiveram a indução da expressão confirmada por *virtual northern blot* e RT-PCR semiquantitativo. Por outro lado, Huvet e colaboradores (2004) obtiveram 376 clones, dos quais apenas 150 apresentaram indução da expressão confirmada por *blot*, enquanto 226 (60%) foram considerados falso positivos ou genes que não tiveram sua expressão alterada pelo tratamento.

Os estudos ecotoxicológicos que avaliam ambientes marinhos e estuarinos muitas vezes utilizam moluscos bivalves como organismos

sentinela. Esses animais são sésseis e de fácil manuseio, representando bem o local de amostragem e são filtradores, bioacumulando contaminantes dispersos na água enquanto se alimentam do fitoplâncton. Esse fato aliado à importância econômica do cultivo de bivalves na aquicultura e a sua importância na manutenção dos ecossistemas tem incentivado o desenvolvimento da genômica dos bivalves (Saavedra e Bachere, 2006).

A ostra *Crassostrea gigas* apresenta ampla distribuição geográfica e é a segunda espécie mais cultivada comercialmente ao redor do mundo. No Brasil a ostra *C.gigas* é a espécie mais cultivada e Santa Catarina é o principal estado produtor de ostras no país com uma produção de 3152,4 ton. em 2006 e 1155,8 ton. em 2007 (<http://www.pmf.sc.gov.br/fenaostra>).

A capital do estado, Florianópolis, é uma cidade turística que fica localizada na Ilha de Santa Catarina, local de prática intensa de aquicultura e que sedia anualmente a Fenaostra, evento turístico que envolve gastronomia e atividades artísticas e culturais para divulgação da ostreicultura.

A exploração do turismo em Florianópolis tem seu ponto máximo na temporada de verão, quando a população da cidade aumenta em quase 100% atingindo a capacidade máxima de acomodação nos hotéis e pousadas da Ilha (<http://www.pmf.sc.gov.br/turismo>). Um fator preocupante associado ao aumento do número de pessoas é o incremento na produção de esgoto doméstico aliado a necessidade de estrutura adequada para a coleta, tratamento e lançamento desses efluentes. O lançamento de esgoto doméstico em águas superficiais é a principal causa de poluição dos ecossistemas marinhos e estuarinos ao redor do mundo (Walker *et al.*, 2001). Dentro desse contexto, as cidades brasileiras carecem de sistemas apropriados para lidar com seus efluentes e os mesmos muitas vezes são lançados sem tratamento diretamente nos ecossistemas (Abessa *et al.*, 2005). Os parâmetros considerados poluentes e que normalmente são monitorados nas estações de tratamento de esgoto são a demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos suspensos (SS), nitrogênio total, nitrito, nitrato e amônia, fósforo orgânico e inorgânico e microrganismos patogênicos, mas análises de metais e contaminantes orgânicos diversos podem também estar presentes (Cameron *et*



*al.*, 2003). Já nos ecossistemas a análise normalmente empregada que reflete a qualidade de água é a microbiológica.

A resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 357) que dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e estabelece condições e padrões para o lançamento de efluentes, define coliformes termotolerantes como: "bactérias gram-negativas, em forma de bacilos, oxidasenegativas, caracterizadas pela atividade da enzima B - galactosidase. Podem crescer em meios contendo agentes tenso-ativos e fermentar a lactose nas temperaturas de 44 – 45 °C, com produção de ácido, gás e aldeído. Além de estarem presentes em fezes humanas e de animais homeotérmicos, ocorrem em solos, plantas ou outras matrizes ambientais que não tenham sido contaminados por material fecal". Conforme afirma a própria resolução, a presença de coliformes não é exclusiva de matéria fecal, sendo que os mesmos já foram detectados em amostras de solo, madeira e cascas de madeira de indústria de papel e celulose em setores que não tem contato com esgoto (Gauthier e Archibald, 2001). A comparação dos dados de contaminação por coliformes com frequência é dificultada pelo fato dos pesquisadores utilizarem métodos diferentes (Hench *et al.*, 2003; Gauthier & Archibald, 2001). Por outro lado as estações de tratamento normalmente apresentam sucesso na redução do número de coliformes presentes no esgoto, por vezes atingindo 99% de eficiência (Hench *et al.*, 2003).

Além do alto teor de matéria orgânica e da presença de patógenos, o esgoto apresenta contaminantes utilizados em grande quantidade no cotidiano, tais como produtos de higiene pessoal e limpeza doméstica, medicamentos humanos e veterinários, surfactantes e resíduos de surfactantes e aditivos industriais. Esses contaminantes não precisam ser persistentes no ecossistema para causar efeitos negativos, visto que são introduzidos continuamente no ambiente (Petrovic *et al.*, 2003). Outro grupo de contaminantes presentes no esgoto são os chamados desreguladores endócrinos. Contaminantes com estrutura química similar a dos hormônios esteróides que interferem principalmente no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas causando alterações no desenvolvimento e falência reprodutiva, principalmente em organismos aquáticos (Leusch *et al.*, 2006). Alguns pesticidas, químicos industriais,

derivados de plástico e produtos de limpeza doméstica estão entre os compostos que se ligam ao receptor de estrógeno induzindo a síntese de vitelogenina em organismos macho (Tilton *et al.*, 2002). Além desses, o hormônio sintético etinilestradiol é prescrito como contraceptivo oral para milhões de mulheres todos os anos. Sua afinidade pelo receptor de estrógeno é maior do que o hormônio natural 17 – B-estradiol. Uma classe de compostos lipofílicos, e desse modo sujeitos à biomagnificação e que estão associados a uma série de desordens crônicas, principalmente reprodutivas, são as bifenilas policloradas (BPCs) (Canesi *et al.*, 2003). BPCs são compostos que apresentam alta estabilidade química e térmica, miscibilidade com compostos orgânicos, alta constante dielétrica e baixo custo. Estas propriedades fizeram com que tivessem uma ampla aplicação comercial sendo utilizados como fluidos dielétricos de transformadores e capacitores, fluidos hidráulicos, lubrificantes, plásticos, retentores de calor e chama, além de transformá-lo em um dos principais contaminantes dos oceanos e estuários nos últimos 50 anos (Kenish, 1997). A produção de BPCs nos Estados Unidos iniciou em 1929 e foi interrompida em 1977 e no Brasil está proibida desde 1981, pela portaria interministerial nº 19 de 29/01/81, entretanto a utilização de equipamentos que contenham BPC está autorizada até sua substituição por outro livre do composto. A composição do esgoto pode incluir ainda outros compostos clorados como os inseticidas dicloro-difenil-tricloroetanos (DDTs), compostos derivados de óleos e graxas como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e derivados de detergentes como os alquilbenzenos lineares (ABLs). Os ABLs são utilizados na formulação de detergentes por apresentarem baixo teor de subprodutos insolúveis e maior rendimento, aumentando a solubilidade do tensoativo e melhorando seu poder de detergência. A estrutura é um dos fatores que afetam a biodegradação do composto e a relação entre os isômeros internos e externos dos ABLs fornece informações sobre o tempo de existência do efluente. Os isômeros externos são aqueles em que o grupo fenila está mais próximo do átomo de carbono terminal da cadeia alquílica e os isômeros internos são aqueles em que o grupo fenila está mais distante. (Penteado *et al.*, 2006). Com o aumento populacional e a escassez de água potável são cada vez mais comuns as iniciativas para armazenar e reutilizar

água. A captação de água para abastecimento da população por vezes ocorre em locais onde à montante existe um lançamento de esgoto tratado. Stackelberg e colaboradores (2004) detectaram a presença de 40 contaminantes orgânicos como tetrahidronaftaleno (fragrância), bisfenol A (fungicida, anti-chama), cafeína (estimulante), carbamazepina (anticonvulsivo) e cotinina (metabólito da nicotina) em reservatório de água potável reutilizada. O tratamento primário de efluentes tem por finalidade remover sólidos em suspensão e compostos que aumentem as demandas química e bioquímica de oxigênio. O tratamento avançado tem por finalidade remover constituintes inorgânicos dissolvidos tais como fosfato. Dessa forma as estações de tratamento de esgoto doméstico não são concebidas com a finalidade de eliminar contaminantes orgânicos que normalmente estão presentes em níveis traço, sendo comum a presença desses elementos no esgoto mesmo após o tratamento.

Florianópolis conta atualmente com cinco estações de tratamento de esgoto em funcionamento, duas em implantação e outra planejada. Atualmente os cultivos de moluscos ocupam cerca de 25% da área disponível para aquicultura. A possibilidade de incremento das duas atividades deve ser trabalhada com planejamento para que um possível conflito seja evitado. Nesse sentido o desenvolvimento de ferramentas de análise sensíveis e capazes de contribuir com programas de fiscalização e gerenciamento da qualidade dos organismos se faz necessário.

O objetivo deste trabalho é identificar genes que possam ser utilizados como biomarcadores de contaminação por esgoto doméstico em programas de monitoramento e gerenciamento ambiental.

## **2      Objetivos**

### **2.1    Geral**

Identificar genes diferencialmente expressos em ostras *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico não tratado, que possam servir como biomarcadores de contaminação em programas de gerenciamento ambiental.

### **2.2    Específicos**

- identificar, clonar e sequenciar genes que tenham a expressão induzida quando as ostras são expostas a esgoto doméstico não tratado;

- depositar as seqüências dos fragmentos gênicos identificados no banco mundial de genes (*Genebank*);

- desenhar iniciadores de DNA para alguns dos genes identificados e avaliar a expressão dos genes individualmente, em ostras expostas a esgoto não tratado em aquários;

- verificar a aplicabilidade dos genes identificados como biomarcadores através de experimento *in situ* de exposição das ostras a locais contaminados por esgoto doméstico.

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Ostra *Crassostrea gigas***

Reino Animalia

Filo Mollusca

Classe Bivalvia

Ordem Ostreoida

Família Ostreidae

Espécie *Crassostrea gigas*

A ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) apresenta concha sólida, extremamente enrugada e laminada. A forma da concha varia muito com o ambiente e a cor é geralmente esbranquiçada por fora e branca por dentro. Apresenta um único músculo adutor que pode ser escuro, mas nunca púrpura ou preto, característica que a difere da espécie *Crassostrea virginica*. Apresenta fase larval planctônica que se desloca pela coluna d'água à procura do substrato ideal para fixação. Prefere substratos firmes e usualmente se fixa sobre rochas ou conchas de outras ostras em profundidades que variam de 5 a 40m. É uma espécie cosmopolita tendo ocorrência registrada no Japão, Coreia, Sibéria, Estados Unidos, Canadá e Austrália. Atualmente foi introduzida em outros países e é uma das espécies mais cultivadas no mundo.

#### **3.2 Exposição ao esgoto doméstico**

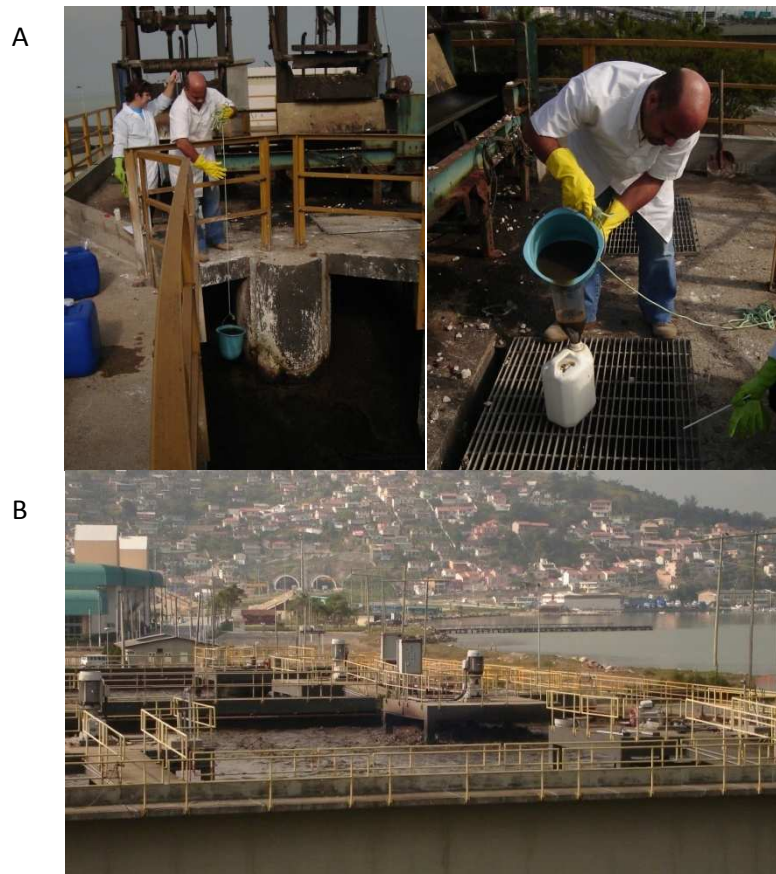
##### **3.2.1 Coleta e aclimação das ostras**

Ostras adultas (7,6 – 12,9 cm) foram coletadas no cultivo do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da UFSC, localizado na praia de Sambaqui, e transportadas em caixas plásticas sem água para a unidade do LMM da Barra da Lagoa. Os animais foram acondicionados dentro do laboratório em dois aquários plásticos de 45 L contendo água marinha filtrada (UV) com salinidade 25 psu, temperatura ambiente e aeração constante por 10 dias. Em um primeiro momento foram colocadas 10 ostras em cada aquário para garantir um número suficiente de animais de um único sexo. Apenas os organismos macho foram utilizados para evitar diferenças na expressão gênica relacionadas ao

sexo. Durante esse período as ostras foram alimentadas uma vez ao dia com  $12 \times 10^4$  céls/mL de microalgas (*Chaetoceros militrans* e *Skeletonema sp*) e a água foi trocada diariamente.

### **3.2.2 Coleta do esgoto**

O esgoto não tratado foi coletado na Estação Insular de Tratamento de Efluentes da Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN), no centro de Florianópolis (Figura 1). As coletas ocorreram sempre no meio da manhã e o esgoto foi coletado na calha Parshall logo após a remoção dos sólidos por gradeamento, ao chegar na estação. Após a coleta o material foi transportado para o LMM em container de plástico escuro (50 L) e permaneceu em uma sala com ar condicionado durante as 48 horas de exposição. A data das coletas foi agendada para coincidir com as coletas regulares realizadas pelos técnicos da CASAN para análise dos parâmetros físicos químicos e microbiológicos do esgoto afluyente.



**Figura 1:** A – Coleta do esgoto doméstico não tratado pelos técnicos em saneamento da Companhia Catarinense de Água e Saneamento (CASAN); B – Vista parcial da Estação de Tratamento de Esgoto Insular da CASAN, Florianópolis, SC.

### 3.2.3 Exposição nos aquários

Após o período de aclimação um dos aquários recebeu 33% de esgoto não tratado enquanto o outro aquário recebeu apenas água marinha diluída com água doce na mesma proporção do esgoto, para manter a salinidade constante em 25 psu (Figura 2). A solução de esgoto e a água marinha foram trocadas diariamente durante a exposição. Durante esse período, as ostras foram observadas por inspeção visual para verificar se estavam abrindo as valvas para respiração e/ou alimentação.

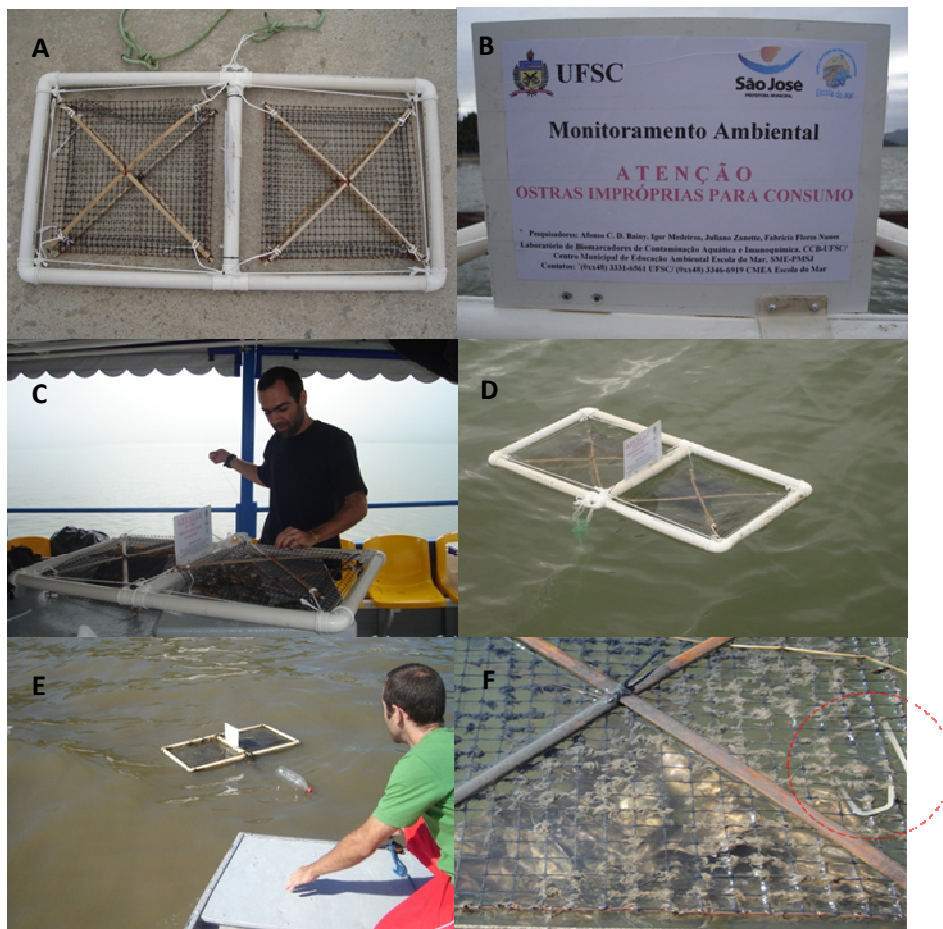


**Figura 2:** Exposição das ostras *Crassostrea gigas* a 33% de esgoto doméstico não tratado por 48 h em aquários de 45 L (n=10).

#### **3.2.4 Exposição a locais contaminados por esgoto doméstico**

Para expor as ostras *Crassostrea gigas* ao local contaminado por esgoto doméstico *in situ* foi desenvolvida uma estrutura flutuante de PVC (Figura 3 A, D e E). Foram colocadas 20 ostras por estrutura, acondicionadas na parte central confeccionada com tela de nylon. A estrutura continha também uma placa indicativa com os dados de identificação do experimento, projeto e contato dos pesquisadores (Figura 3B). As estruturas foram colocadas nos pontos de amostragem com auxílio de poitas de concreto e cabos de nylon.



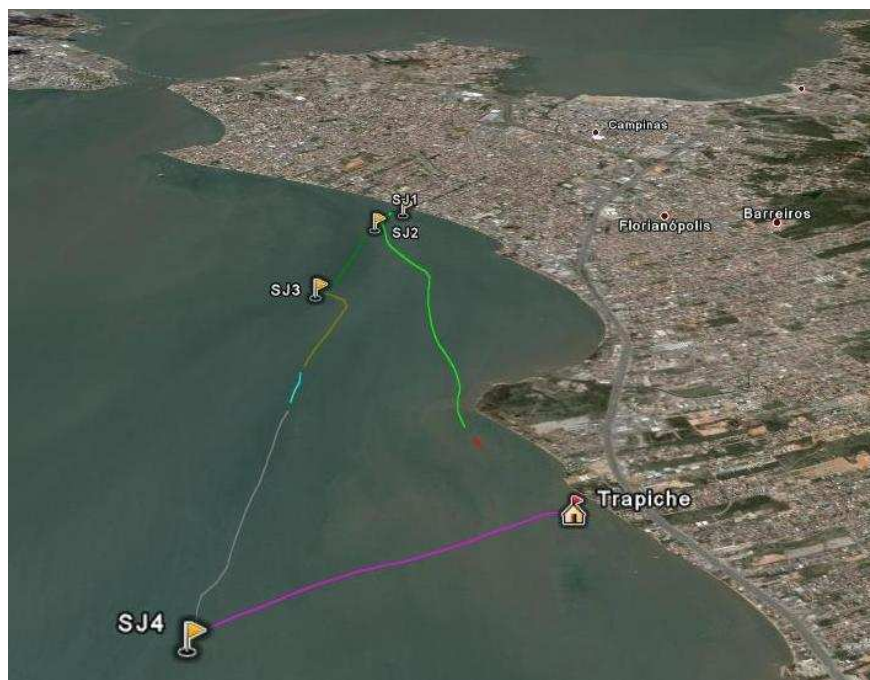


**Figura 3:** A – Estrutura flutuante de PVC para exposição das ostras aos locais contaminados; B – Placa de identificação com os dados do experimento; C – Montagem da estrutura com as ostras; D – Estrutura flutuando em um dos pontos amostrais; E – Recuperação da estrutura com as ostras no ponto poluído; F – Malha plástica com as ostras com destaque para uma alça plástica de aromatizante de vaso sanitário.

Foram definidos 4 locais de exposição afastando-se da foz do Rio Bücheller adentrando na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina, SC (Figura 4). Os locais 1, 2, 3 e 4 estão distantes 15, 400, 1500 e 4500 m respectivamente da foz do Rio Bücheller. A escolha destes locais se baseou em um estudo anterior realizado devido a uma parceria entre a Escola do Mar do município de São José, SC, e o Centro Federal de Educação Tecnológica (CEFET-SC) que realizou análises periódicas no local (Projeto Baía Limpa - monitoramento de parâmetros físicos, químicos e microbiológicos). Este estudo confirmou a

existência de um gradiente de contaminação por coliformes totais e fecais entre estes locais. Nesse trabalho as ostras permaneceram nos locais amostrais por 14 dias (31/08 – 14/09/2006). Ao final do experimento as estruturas foram recuperadas e transferidas para o laboratório para preparo da amostra. Enquanto permaneceram no laboratório os animais ficaram em aquários com água marinha de cada local de exposição. Para analisar a presença de contaminantes orgânicos nas ostras e no sedimento foram congeladas 3 ostras a -20 °C e foi coletada uma amostra de sedimento por ponto amostral com pegador tipo “van Veen”.

No início, durante e ao final da exposição foram analisados os parâmetros físico e químicos (temperatura, oxigênio dissolvido, pH, salinidade e turbidez) da água marinha dos locais de exposição e foram coletadas amostras de água para análise de DBO<sub>5</sub>, NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, PO<sub>3</sub> e coliformes fecais. A coleta e a análise das amostras de água obtida nos locais de exposição foram realizadas segundo técnicas do *STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER APHA-AWWA-WPCF*, 20<sup>a</sup> edição.



**Figura 4:** Vista parcial da Baía Norte da ilha de Santa Catarina. SJ1 – Local 1 (Foz do Rio Bücheller); SJ2 – Local 2; SJ3 – Local 3 (cultivo de moluscos); SJ4 – Local 4 (Pedra das Tipitingas – local referência); Trapiche – Escola do Mar, São José, SC.

### 3.3 Análises Químicas

A análise dos contaminantes orgânicos presentes nas ostras ( $n=10$  por local amostral) e no sedimento dos locais de exposição do experimento *in situ* foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Química Orgânica Marinha do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP).

Os tecidos congelados da *Crassostrea gigas* foram secos durante 72 horas em liofilizador Thermo Savant – modulyo D. Em seguida, as amostras foram maceradas e homogeneizadas em almofariz com pistilo e armazenadas em frascos de vidro previamente limpos com solvente.

O procedimento metodológico descrito a seguir foi baseado em MacLeod e colaboradores (1986) com algumas modificações. Um grama de cada uma das amostras foi extraído com n-hexano e diclorometano 50% (v/v) em soxhlet durante 8 horas. Foram utilizados solventes com grau de pureza “para análise de resíduos orgânicos” (J. T. Baker, Estados Unidos). Antes da extração foram

adicionados 100  $\mu\text{L}$  dos padrões internos (surrogate) com diferentes concentrações no branco e em cada uma das amostras. Para os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foram adicionados naftaleno- $\text{d}_8$ , acenafteno- $\text{d}_{10}$ , fenantreno- $\text{d}_{10}$ , criseno- $\text{d}_{12}$  e perileno- $\text{d}_{12}$  ( $5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ); para os bifenilos policlorados (BPCs) e pesticidas organoclorados foram utilizados o PCB-103 e PCB-198 ( $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ); o padrão interno dos alquilbenzeno lineares (ABLs) foi o dodecil alquilbenzeno ( $1\text{C}_{12}\text{LAB}$ ,  $5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ).

O extrato evaporado foi submetido a uma coluna cromatográfica contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina (ambas da Merck) 5% desativadas com água pré-extraída e 1 grama de sulfato de sódio da J. T. Baker no topo. A eluição foi feita com 80 mL de uma mistura de n-hexano e diclorometano (50%). Para purificação complementar, o eluato foi concentrado a 0,5 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alto desempenho (HPLC) da Perkin Elmer equipado com duas colunas de exclusão (permeação em gel). A fase móvel utilizada foi o diclorometano. O eluato foi concentrado novamente e foram adicionados os padrões internos cromatográficos (octacloronaftaleno para HPAs, TCMX para BPCs e pesticidas e  $1\text{C}_{19}\text{LAB}$  para os ABLs). O volume final foi de 1 mL.

Uma alíquota do extrato final foi injetada no cromatógrafo a gás equipado com detector de captura de elétrons (GC-ECD) da Agilent Technologies para análise de pesticidas organoclorados. Os demais grupos de compostos (HPAs, BPCs e ABLs) foram analisados no cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas (GC-MS) 6890/5973N da Agilent Technologies.

As temperaturas do injetor e detector do GC-ECD foram de  $280^\circ\text{C}$  e  $300^\circ\text{C}$ , respectivamente. O gás de arraste foi o hidrogênio ultrapuro e o gás auxiliar foi o nitrogênio. A coluna cromatográfica era de 30 metros de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 5% fenilmetilsiloxana de  $0,5 \mu\text{m}$  da marca J&W Scientific. A rampa de temperatura utilizada foi: início a  $70^\circ\text{C}$  por 1 minuto, aumento a uma taxa de  $40^\circ\text{C}$  até  $170^\circ\text{C}$  e a  $1,5^\circ\text{C}$  até  $240^\circ\text{C}$ , permanecendo nesta temperatura por 2 minutos, e aumentando novamente a  $15^\circ\text{C}$  até  $300^\circ\text{C}$  permanecendo isotérmico por 5 minutos.

As temperaturas do GC-MS foram de  $280^\circ\text{C}$ ,  $280^\circ\text{C}$  e  $300^\circ\text{C}$  no injetor, na interface e na fonte de íons, respectivamente. A coluna cromatográfica

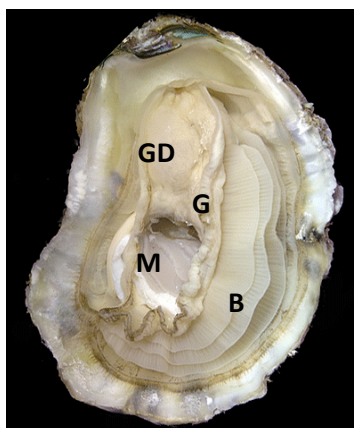
utilizada foi da J&W Scientific com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. O modo de aquisição foi o SIM (monitoramento seletivo de íons). A rampa de temperatura para BPCs foi: início a 75 °C durante 3 minutos, aumento a uma taxa de 15 °C até 150 °C e a 2 °C até 260 °C e a 20 °C até 300 °C permanecendo constante durante 1 minuto. A rampa para os HPAs e ABLs teve início em 40 °C com aumento a taxa de 20 °C até 60 °C e a 5°C min<sup>-1</sup> até 290 °C onde permaneceu por 5 minutos e aumento a 10 °C até 300 °C onde permaneceu constante durante 10 minutos.

A identificação dos pesticidas, HPAs, BPCs e ABLs foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard, EUA. Os compostos analisados no GC-MS também foram identificados também através do espectro de massa. A quantificação foi feita por razões entre os surrogates e os compostos de interesse, baseada nas curvas analíticas montadas com pelo menos 05 concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

### **3.4 Análises Moleculares**

#### **3.4.1 Preparo da amostra**

Após as exposições foi realizada a biometria das ostras e estas foram mortas por rompimento do músculo adutor (Figura 5). A biometria permite calcular o Índice de Condição (I.C.), obtido pela razão entre o peso da carne e o peso da concha multiplicado por 100 ((PCarne/PConcha)\*100)(Domingos *et al*, 2007). As brânquias foram dissecadas e armazenadas em solução para preservação do RNA (RNAlater – Ambion) e o sexo foi identificado por microscopia das gônadas. Apenas os animais machos foram utilizados nos experimentos. Além das brânquias, a glândula digestiva também foi dissecada no experimento *in situ*.



**Figura 5:** Ostra *Crassostrea gigas* com destaque para glândula digestiva (GD); gônadas (G); músculo adutor (M) e brânquias (B).

### 3.4.2 Identificação dos genes diferencialmente expressos

#### 3.4.2.1 Extração RNA total

As brânquias das ostras foram lavadas duas vezes com 1 mL de tampão TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA pH 8,0) seguido de centrifugação a 2000 g por 2 minutos a 4 °C, para remoção do muco e fitoplâncton. Esse procedimento não foi realizado com as amostras de glândula digestiva.

A extração do RNA total das brânquias e glândula digestiva foi realizada em homogeneizador do tipo Potter com um reagente comercial a base de etanol e tiocianato de guanidina (TRIzol - Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante com poucas modificações (proporção 200 mg tecido / 1 mL de Trizol; 30 minutos de incubação após a homogeneização). Nessa primeira etapa foi extraído RNA total de uma amostra do grupo controle (pool 3 animais; 1 g de tecido) e uma amostra do grupo exposto (pool 3 animais; 1 g de tecido).

Ao final da extração as amostras foram ressuspensas em 100 µL de água para biologia molecular.

Após a extração, a concentração e a pureza do RNA foram checadas em espectrofotômetro a 260 nm e pela razão da absorbância 260/280 nm, respectivamente. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% formaldeído 5% em tampão MOPS 1x corado com brometo de etídio e observado sob luz ultravioleta.

#### 3.4.2.2 Purificação do RNA mensageiro

O RNAmensageiro foi isolado com o kit comercial Oligotex mRNA Midi kit (Qiagen). Esse kit utiliza contas de látex contendo oligonucleotídeos de timina (oligo-dT) que hibridizam com a cauda poli-A dos RNA mensageiros presentes na amostra, sendo que os demais tipos de RNA não são capturados.

O procedimento foi realizado com 1mg de RNA total dos grupos controle e exposto (foi necessário juntar amostras de 2 extrações de RNA total de cada grupo para obter a quantidade necessária), totalmente de acordo com as instruções do fabricante do kit. O RNAm foi concentrado com a adição de 0,1 vol. de NaAc pH 5,2 e 2,5 vol. de isopropanol, incubado a -20 °C por 1 h. Após a incubação a amostra foi centrifugada a 14.000 g / 20 min / 4 °C e lavada 2 vezes com etanol 80%. O pellet foi ressuspendido em água. Para obter a quantidade de RNAm necessária para a hibridização subtrativa foram reunidas amostras de duas extrações de cada grupo. A concentração e pureza do RNAm foram avaliadas conforme descrito acima.

#### 3.4.2.3 Hibridização subtrativa supressiva

A partir de 2 µg de RNAm das brânquias das ostras dos grupos controle e exposto ao esgoto foi realizada a hibridização subtrativa após a síntese do cDNA, com o kit PCR Select cDNA Subtraction Kit (Clontech). Este kit permite a hibridização dos fragmentos de cDNA comuns aos dois grupos (controle e exposto), enquanto os fragmentos diferencialmente expressos são amplificados por reações de PCR ao final do procedimento.

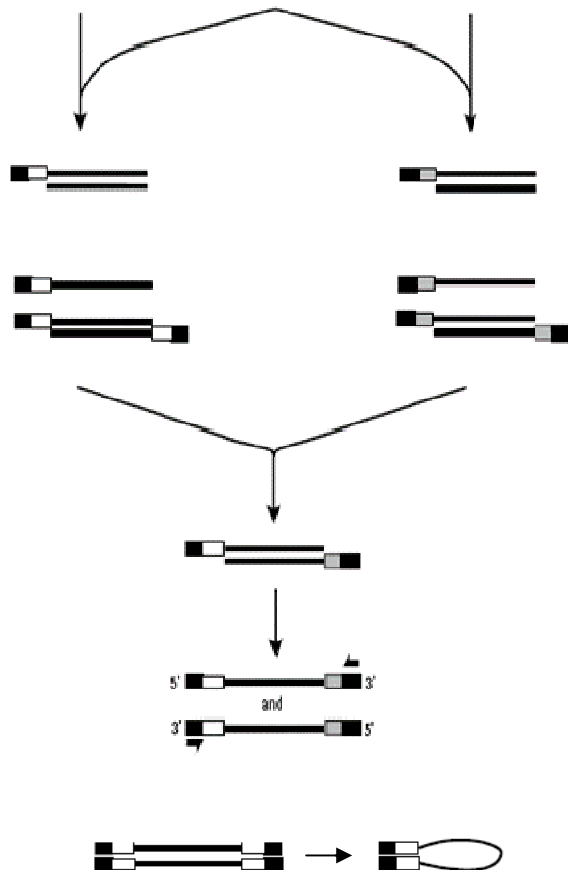
O processo da hibridização subtrativa começou com a síntese de cDNA a partir de mRNA, e subsequente digestão desse material pela enzima de restrição Hae III. Uma das populações de cDNA, denominada de *tester* e cujos genes diferencialmente expressos foram amplificados, foi dividida em dois grupos e a cada um desses grupos foi ligado um oligonucleotídeo adaptador específico na extremidade 5' (Figura 1). Após a ligação dos adaptadores, adicionou-se a cada uma das porções de *tester* determinada quantidade do outro grupo de fragmentos, denominada de *driver*, para que ocorresse a hibridização dos fragmentos comuns aos dois grupos (desnaturação 98 °C / 90s; hibridização 8 h / 68 °C). A seguir realizou-se uma segunda hibridização, unindo as duas porções do *tester* e adicionando-se novamente o *driver* (20 h /

68 °C), porém sem prévia desnaturação. Essa hibridização originou moléculas contendo os dois adaptadores diferentes (hibridização dos *tester* entre si), que representam os genes diferencialmente expressos (presentes apenas na amostra *tester*) e que foram então amplificados pelo PCR supressivo. As amostras dos animais expostos ao esgoto compuseram o grupo *tester*, de modo que foram analisados os genes diferencialmente expressos nesse grupo (genes cuja expressão foi induzida após a exposição ao esgoto).

Para realização da reação de PCR supressivo as extremidades complementares aos adaptadores foram preenchidas através da incubação da reação a 75 °C por 5 minutos, criando pontos de ancoragem para os iniciadores de DNA. Nessa reação as moléculas com sequências complementares nas duas extremidades apresentam forte tendência a hibridizar consigo mesmas formando uma alça, ao invés de anelar com os iniciadores da reação. Quando ocasionalmente um iniciador consegue anelar e é estendido, a molécula formada também contém sequências complementares nas extremidades e é suprimida. Assim somente os cDNAs com diferentes adaptadores nas duas extremidades foram amplificados exponencialmente nessa reação. A segunda reação, denominada *nested PCR*, foi realizada para reduzir ainda mais o *background*, enriquecendo os transcritos diferencialmente expressos e fazendo com que transcritos diferentes que variavam em abundância na amostra original de RNAm apresentem-se em proporções aproximadamente iguais.



*Tester – Adp 1*      *Driver*      *Tester – Adp 2*



**1ª Hibridização** (mistura o grupo *driver* com cada um dos grupos *tester* em separado).

Genes comuns aos dois grupos.

Genes presentes apenas no grupo exposto.

**2ª Hibridização** (mistura os 2 grupos *tester* e adiciona mais do grupo *driver*).

Adição de *primers* e amplificação por PCR.

Ausência de amplificação das moléculas com adaptadores iguais.

**Figura 6:** Esquema ilustrativo da hibridização subtrativa supressiva (adaptado de Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit User Manual).

#### **3.4.2.4 Clonagem dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos**

Os produtos de PCR diferencialmente expressos foram purificados pelo kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) e ligados em vetores pGEM-T<sup>®</sup> Easy (Promega) para transformação das células competentes JM-109, através de choque térmico. Estas células são recomendadas pelo fabricante por serem compatíveis com o sistema de identificação colorimétrica de eficiência da transformação.

Após a transformação, 200 µl da solução contendo as bactérias transformadas foram aplicados em placa contendo ágar 35 g/L (LB Agar-Sigma), ampicilina (100 mM), IPTG 0,5 mM e X-Gal 50 mM e deixadas a 37 °C por 18 horas para crescimento de colônias.

Ao final do procedimento, as colônias de bactérias que possuíam o plasmídeo com o inserto apresentaram cor branca. Todas as colônias brancas foram transferidas separadamente para tubos de ensaio contendo meio de cultura líquido 20 g/L (LB Broth - Sigma) durante 18 horas a 37 °C em agitação constante para amplificação da concentração de cDNA.

#### **3.4.2.5 Purificação do plasmídeo**

A purificação do plasmídeo foi feita a partir de 3 mL do meio líquido contendo a colônia utilizando o kit Perfectprep<sup>®</sup> Plasmid Mini (Eppendorf) de acordo com as instruções do fabricante.

A concentração do material purificado foi checada em espectrofotômetro a 280 nm e a inserção do plasmídeo foi conferida através de eletroforese em gel de agarose 1,2% após a digestão do plasmídeo pela enzima ECO RI.

#### **3.4.2.6 Sequenciamento**

Os fragmentos de cDNA diferencialmente expressos e purificados foram encaminhados para sequenciamento no Laboratório de Hanseníase (FIOCRUZ) em colaboração com o Dr. Milton Ozório de Moraes. Para o sequenciamento foi utilizado um sequenciador ABI3730 de 48 capilares (Applied Biosystems). O seqüenciamento foi realizado com o kit ABI Prism Big

Dye Terminator Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystems). A manipulação das seqüências foi realizada com o programa para Edição de Seqüências Bioedit (Hall, 1999).

#### **3.4.2.7 Análise das seqüências**

As seqüências obtidas foram comparadas com o banco de dados disponíveis no banco de genes. A análise dos dados foi realizada com o programa tBLASTn (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

### **3.4.3 Análise dos genes diferencialmente expressos na exposição ao esgoto em aquários**

#### **3.4.3.1 Extração RNA total das brânquias de ostras**

O RNA total das brânquias de 5 ostras macho dos grupos controle e exposto foram extraídos individualmente, conforme descrito acima e tiveram sua pureza e integridade verificadas em espectrofotômetro (3.4.2.1).

#### **3.4.3.2 Síntese de cDNA das brânquias de ostras**

A síntese do cDNA foi realizada com o kit Omniscript™ Reverse Transcriptase (Qiagen) a partir de 2 µg de RNA total acrescido de dNTP 5 mM; oligo-(dT)15 (Promega) 1 µM; inibidor de RNase 10U, transcriptase reversa omniscript 4U. As amostras foram incubadas por 60 minutos a 37 °C e posteriormente armazenadas a -20 °C. A concentração e a pureza do cDNA foram checadas em espectrofotômetro a 260 nm e pela razão da absorbância 260/280 nm, respectivamente.

#### **3.4.3.3 Desenho dos iniciadores de DNA**

Para confirmação da indução da expressão gênica nas ostras expostas ao esgoto foram desenhados iniciadores de DNA com o *software* Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) para 5 dos genes identificados (Tabela I). Esses genes estão envolvidos em mecanismos de biotransformação de fases I, II e III (Citocromo P450 - *CYP 356A1*; Glutathione S-transferase classe ômega - *GSTO* e proteína de resistência a múltiplas drogas - *MDR*), ligação e transporte de ácidos graxos e compostos hidrofóbicos (*FABP*) e síntese do grupo heme

(*ALAS*). Além desses desenhou-se iniciadores também para o gene constitutivo gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*).

**Tabela 1:** Pares de iniciadores e tamanho esperado dos fragmentos gênicos analisados nas brânquias de *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico não tratado.

Gene	Iniciadores	Expected size (bp)
<b>CYP356A1</b>	sense: 5'CCA GAA GAA TTT GAC CCA CTT CG 3' antisense: 5'TTT GTA ATC GGA CGG AAG CTC TAC 3'	249
<b>GSTO</b>	sense: 5'GGT GTA TCC CGA TAA CAA GCT GAC 3' antisense: 5'CTG AGG GTC CAG TCG ACA TTT TT 3'	362
<b>MDR</b>	sense: 5'GGC AGT CAT GTT CTT TGC CTA TG 3' antisense: 5'GCA GCC ATT GGA CAT TTA GAT CCT 3'	443
<b>FABP</b>	sense: 5' GTT TGA GGG AAA CTG GGA ATG C 3' antisense: 5' TCC GTC GGA ATA TGT CAG TTT AGC 3'	255
<b>ALAS</b>	sense: 5'AGA CCT CAC ACT CAT CCG GAC AGA CAG 3' antisense: 5' CTT CAC TAC CAG TCT CCT CCC ACC AC 3'	427
<b>GAPDH</b>	sense: 5' ACT CCA AAG ACC AGA ACA TCG T 3' antisense: 5'CAA AGC TGT CGG AAA GGT TAT C 3'	275

#### 3.4.3.4 Padronização das condições de PCR

As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se o kit de PCR da empresa Biosystems (Biosystems Comercial, Importadora, Exportadora de Equipamentos de Laboratório Ltda) e continham Tampão PCR 1x, Taq Biosystems (1U), dNTPmix (10 mM cada dNTP), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), iniciadores *sense* e *antisense* (10 µM) e 1,2 µg de cDNA.

Os pares de iniciadores utilizados nas reações de PCR foram testados em ensaio preliminar para otimizar as condições de amplificação do cDNA e estabelecer o número de ciclos ideais para cada reação, visando analisar a expressão de cDNA em sua fase exponencial de amplificação.

Definido o número de ciclos para cada gene, foi realizado um PCR semi-quantitativo com o cDNA das brânquias de ostras macho dos grupos controle e exposto (n=5).

Ao iniciar as análises moleculares das amostras de ostras expostas a esgoto no ambiente, o kit de PCR foi substituído pelo da empresa Biotoools (Biotechnological & Medical Laboratories-SA, Espanha). As condições da reação de PCR foram mantidas, entretanto foi realizada nova padronização do número de ciclos para cada gene analisado.

#### 3.4.3.5 Análise da expressão gênica por RT-PCR semi-quantitativo

As reações de RT-PCR foram realizadas em um termociclador TGradient (Biometra) conforme descrito na Tabela 2.

**Tabela 2:** condições das reações de RT-PCR para análise da expressão gênica em brânquias de *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico não tratado.

Gene	PCR
<i>CYP356A1</i>	2 min. 94°C; 25 ciclos de 94°C por 15s, 51°C por 45s e 72°C por 60s.
<i>GSTO</i>	20 ciclos de 94°C por 30s, 52°C por 45s e 72°C por 60s.
<i>MDR</i>	2 min. 94°C; 32 ciclos de 94°C por 30s, 52°C por 45s e 72°C por 60s.
<i>FABP</i>	2 min. 94°C; 5 ciclos de 94°C por 15s diminuindo 2°C da temperatura de anelamento por ciclo, iniciando em 60°C, 72°C por 30s; 18 ciclos de 94°C por 15s, 51°C por 45s e 72°C por 30s.
<i>ALAS</i>	26 ciclos de 94°C por 30s, 58°C por 30s e 72°C por 30s.
<i>GAPDH</i>	2 min. 94°C; 27 ciclos de 94°C por 15s, 49°C por 45s e 72°C por 60s.

#### **3.4.3.6 Eletroforese em gel de agarose**

Os produtos das reações de PCR foram analisados em gel de agarose 1,2%/TAE 1X, corado com brometo de etídeo (0,7 µg/ml). Foram aplicados 10 µl de cada amostra com o tampão 6X azul/laranja (Promega). Após a eletroforese o gel foi visualizado e fotografado em luz U/V para realizar a densitometria.

#### **3.4.3.7 Densitometria**

A intensidade das bandas com o material amplificado dos genes *CYP356A1*, *GSTO*, *MDR*, *ALAS* e *FABP* foi analisada por densitometria com o software GelQuant. Para normalização da expressão dos genes supracitados foi utilizada a expressão do gene *GAPDH*, que não apresentou variação entre os grupos.

#### **3.4.4 Análise dos genes diferencialmente expressos na exposição ao esgoto no ambiente**

Cinco ostras macho mantidas por 14 dias em cada local de exposição (Figura 4) foram separadas para extração do RNA total e síntese do cDNA conforme descrito nos itens 3.4.2.1 e 3.4.3.2. A expressão dos genes *CYP356A1*, *GST*, *MDR*, *FABP* e *ALAS* foi analisada por PCR semi-quantitativo com iniciadores específicos nas mesmas condições descritas no item 3.4.3.5, entretanto o gene normalizador utilizado foi o da Actina (*ACT*: 94 °C por 2 min.; 25 ciclos de 94 °C / 15s, 61 °C / 45s e 72 °C / 30s). O produto da reação de PCR foi analisado em eletroforese em gel de agarose e submetido à densitometria conforme já descrito (3.4.3.6 e 3.4.3.7).

#### **3.4.5 Análise Estatística dos dados**

Os dados obtidos pela densitometria dos fragmentos amplificados nos experimentos de RT-PCR semiquantitativo da exposição em aquários foram comparados estatisticamente pelo teste *t* de Student utilizando-se um  $p < 0,02$ .

Para a comparação entre os grupos dos diferentes locais amostrais no experimento de campo foi utilizado o teste de análise de variância de uma via,

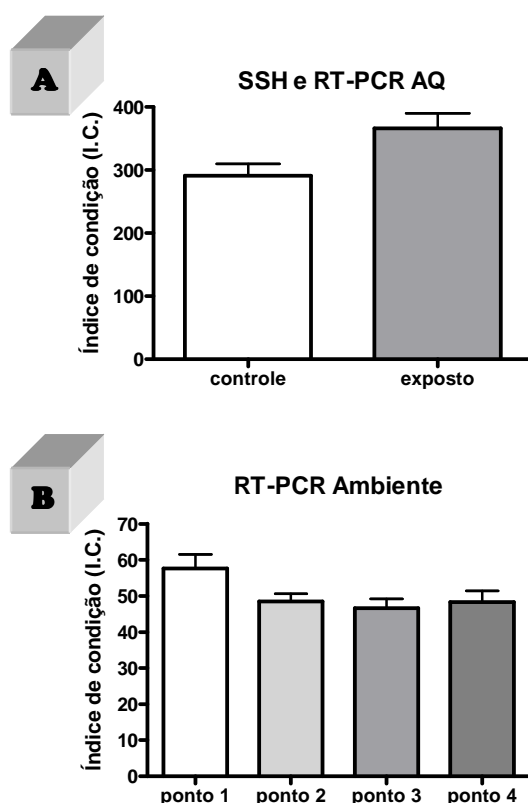
uma vez que os dados apresentaram distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnoff.



## 4 Resultados

### 4.1 Índice de Condição das ostras (I.C.)

A partir da biometria dos organismos analisados nos experimentos foi calculado o índice de condição, que expressa a relação percentual entre o peso úmido da carne e o peso da concha (Figura 7).



**Figura 7:** Índice de condição  $((\text{peso da carne}/\text{peso da concha}) \times 100)$  das ostras utilizadas nos dois experimentos de exposição ao esgoto. A – hibridização subtrativa supressiva e análise da expressão gênica em aquários (n=10 em cada grupo); B – análise da expressão gênica no ambiente (n=5 em cada grupo). Média e desvio padrão.

Nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos amostrais nos experimentos realizados foi observada. Nos experimentos de hibridização subtrativa supressiva e análise da expressão gênica por RT-PCR semi-quantitativo, ambos realizados em aquários, as ostras apresentaram os

valores mais altos de índice de condição (CONT. 291,3%; EXP. 366,1%) (Figura 7 A). Essas ostras apresentaram um comprimento médio de 9,7 cm. As ostras transplantadas para locais contaminados por esgoto tinham um comprimento médio de 7,7 cm e apresentaram Índice de Condição menor (entre 57,6% e 46,6%) (Figura 7B).

#### 4.2 Análise do esgoto

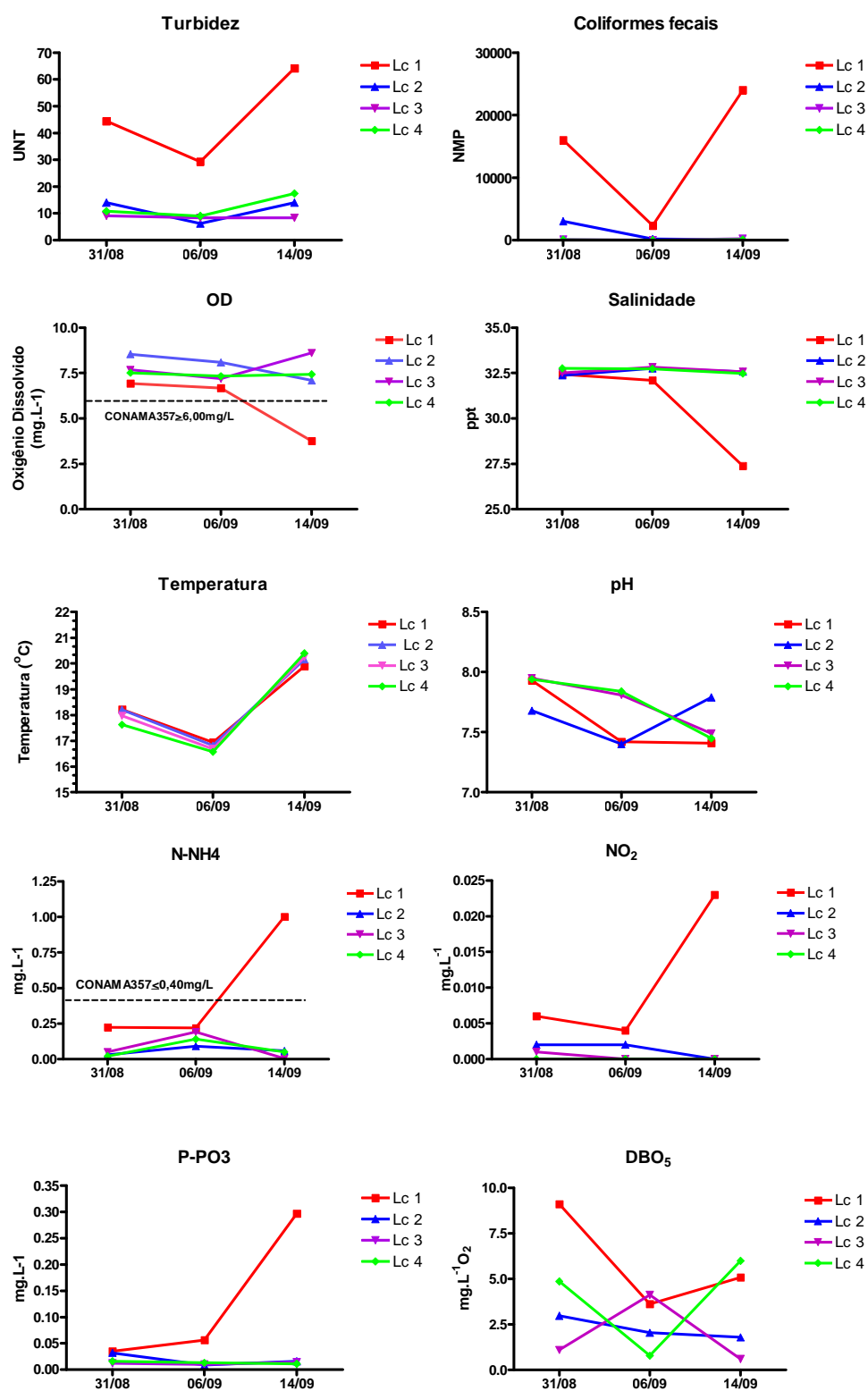
O esgoto coletado na Estação de Tratamento Insular da CASAN apresentava coloração cinza claro e odor oleoso desagradável. A Tabela 3 apresenta os valores das análises químicas e microbiológicas da coleta que foi realizada nas primeiras horas da manhã.

**Tabela 3:** Parâmetros químicos e microbiológicos do esgoto doméstico não tratado.

DQO (mg/L)	DBO <sub>5</sub> (mg/L)	Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> )	Cloretos (mgCl <sup>-</sup> /L)	Coliformes totais (NMP)	Coliformes fecais (NMP)
335	218,4	210,4	57,5	2,9x10 <sup>9</sup>	3,6x10 <sup>8</sup>

#### 4.3 Fatores Abióticos e Análises Químicas

Durante o experimento *in situ* foram coletadas amostras de água superficial no início, após 7 dias e após 14 dias de exposição para a realização das análises físicas, químicas e microbiológicas. Os resultados de turbidez, coliformes fecais, nitrogênio amoniacal, nitrito e fosfato são mais altos no local contaminado e apresentam os maiores valores na última coleta. Já o oxigênio dissolvido e a salinidade apresentam os menores valores nesse local com uma queda na coleta do último dia (Figura 8).



**Figura 8.** Parâmetros físicos e químicos na água dos locais 1, 2, 3 e 4 durante a exposição *in situ*.

Também foi observado um gradiente de contaminação desde o local 1 até o 4, identificado pelos teores de coliformes fecais na água (Figura 8), alquil benzenos lineares (ABLs) e dicloro-difenil-tricloroetanos (DDTs) no sedimento (Tabela 4) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (BPCs), ABLs e DDTs nas ostras mantidas nestes locais (Tabela 5). A relação entre os isômeros internos e externos dos ABLs variou entre 0,3 e 0,8 no sedimento e 0,79 e 2,11 nas ostras.

**Tabela 4:** Concentração de contaminantes orgânicos nas amostras de sedimento dos locais de exposição do experimento *in situ*.

	Local 1	Local 2	Local 3	Local 4
HPAs totais (ng/g ps)	93,76	73,48	127,81	92,46
BPCs totais (ng/g ps)	-	3,79	-	-
ABLs (ng/g ps)	628	609,7	464,7	313,8
ABLs (I/E)	0,8	0,4	0,5	0,3
Esteróis totais (µg/g ps)	13,40	20,33	-	0,07
Coprostanol (µg/g ps)	5,40	1,00	-	-
Colesterol (µg/g ps)	2,95	13,94	-	0,07
Colestanol (µg/g ps)	1,47	0,92	-	-
DDTs (ng/g ps)	1,08	0,37	0,37	0,16

(-) abaixo do limite de detecção.

Importante ressaltar que o local 4, considerado como referência, apresentou níveis baixos de HPAs e ABLs no sedimento (Tabela 4) e HPAs, BPCs e ABLs nas ostras (Tabela 5). Além disso, as ostras analisadas no tempo zero, provenientes do cultivo do LMM em Sambaqui, também apresentaram concentrações detectáveis de HPAs, BPCs, ABLs e DDTs (Tabela 5).

**Tabela 5:** Concentração dos contaminantes orgânicos nas ostras *Crassostrea gigas* mantidas nos locais de exposição durante o experimento *in situ*

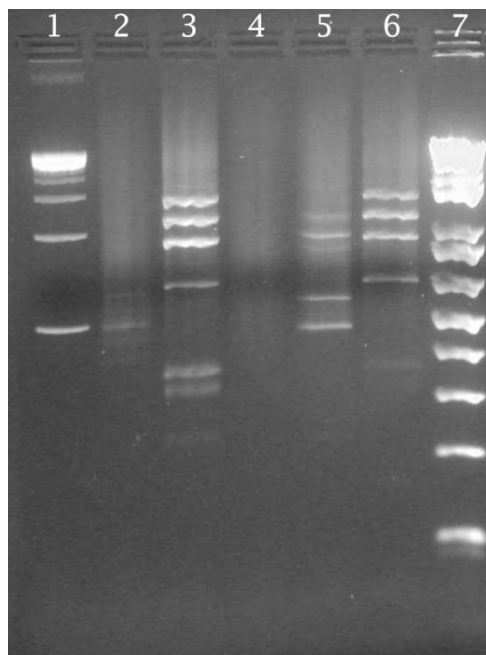
	Tempo Zero	Local 1	Local 2	Local 3	Local 4
HPAs totais (ng/g ps)	100	335	117	97	100
BPCs totais (ng/g ps)	9,05	44,70	17,7	23,5	23,4
ABLs (ng/g ps)	132	965	236	210	178
ABLs (I/E)	0,88	2,11	1,05	0,79	0,87
DDTs (ng/g ps)	3,40	7	-	-	-

(n=3) (-) abaixo do limite de detecção.

#### 4.4 Identificação dos genes diferencialmente expressos

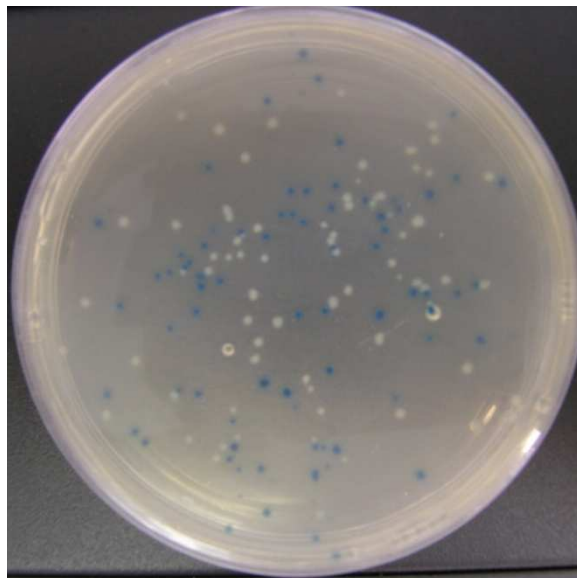
A partir de 1g de brânquia de *Crassostrea gigas* (pool de 3 animais) foi possível extrair entre 934,46 e 968,69 µg de RNA total apresentando uma razão 260/280 nm entre 1,90 e 1,96. A purificação do RNAm resultou em 6,04 e 8,9 µg de RNAm para os grupos controle e exposto, respectivamente, porém com concentrações de 0,18 e 0,12 µg/ µL, muito baixas para a realização da hibridização subtrativa supressiva (HSS). Dessa forma realizou-se a concentração e precipitação das amostras resultando em 11,42 e 6,05 µg com concentrações de 0,81 e 0,67 µg/ µL para os grupos controle e exposto, quantidades e concentrações suficientes para realizar a HSS.

O produto do primeiro e do último PCR da HSS, contendo os genes que tiveram sua expressão induzida pela exposição ao esgoto, bem como da amostra não subtraída e os controles do Kit podem ser visualizados na Figura 9. É possível observar as bandas na posição 5, indicando a presença dos fragmentos gênicos na amostra do último PCR do método, após as duas hibridizações subtrativas.



**Figura 9:** Produtos de PCR da hibridização subtrativa supressiva em gel de agarose 2% TAE 1X. 1. Marcador de peso molecular  $\Phi$ X 174DNA/*Hae*III; 2. Produto do primeiro PCR após a hibridização subtrativa supressiva das ostras expostas ao esgoto (subtração *forward*); 3. Produto do primeiro PCR de músculo esquelético humano (controle do kit); 4. Amostra não subtraída da hibridização das ostras expostas ao esgoto; 5. Produto do *Nested* PCR das ostras expostas ao esgoto; 6. Produto do *Nested* PCR de músculo esquelético humano. 7. Marcador de peso molecular de 1kb.

O produto da HSS foi clonado em células JM109 ligados ao plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) e o resultado da transformação pode ser observado na Figura 10. A placa mostra um bom número de colônias sendo várias delas com o plasmídeo contendo o inserto (colônias brancas).



**Figura 10:** Placa de Petri com as colônias de células JM109 (Promega) contendo os clones resultantes da hibridização subtrativa supressiva. Colônias brancas – células com plasmídeo; colônias azuis – células sem plasmídeo.

Após extração do plasmídeo e verificação da presença do inserto por digestão com EcoRI, foi realizada a reação de PCR para o seqüenciamento dos fragmentos. Foram obtidos 61 clones, dos quais 15 foram identificados. A tabela 6 apresenta os genes que tiveram sua expressão induzida nas brânquias das ostras expostas ao esgoto doméstico. Os dados mostram que diferentes vias do metabolismo das ostras foram alteradas pela exposição ao esgoto. Genes associados à síntese protéica, metabolismo aeróbico e transporte de solutos tiveram sua expressão aumentada quando as ostras foram expostas ao contaminante. Os genes associados à biotransformação de xenobióticos, como o citocromo P450 subfamília CYP356A1, glutathione S-transferase classe ômega (*GSTO*) e proteína de resistência a múltiplas drogas (*MDR*) também tiveram sua expressão aumentada. Um dos clones mais redundantes foi o da proteína ligante de ácidos graxos (*FABP*), família de proteínas citosólicas que ligam não covalentemente ligantes hidrofóbicos, principalmente ácidos graxos. Esses quatro genes, acrescidos do gene aminolevulinato sintase (*ALAS*), responsável por catalisar o primeiro passo na via de síntese do grupo heme, foram selecionados para confirmação da

indução de sua expressão em brânquias de ostras após exposição ao esgoto doméstico não tratado

**Tabela 6:** Lista dos genes que tiveram sua expressão induzida pela exposição ao esgoto, identificados pela hibridização subtrativa supressiva.

Homólogo (proteína ou DNA)	E value	Acesso no Genebank*	Tamanho*	Espécie comparada	Acesso ao Genebank**	Tamanho**
Citocromo P450 3561A	3e-24	EF645271	413 pb	<i>Squalus acanthias</i>	AAB34256	509 aa
Glutathione S-transferase classe ômega	4e-22	-	506 pb	<i>Crassostrea gigas</i>	CAD89618	243aa
Proteína de resistência a multidroga	1e-52	EU073425	565 pb	<i>Gallus gallus</i>	XP_418636	1307 aa
Similar a proteína Acil CoA Oxidase	1e-38	EU108716	628 pb	<i>Danio rerio</i>	AAH83524	660 aa
Isoforma A da Oxidase alternativa	1e-91	EU108720	877 pb	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	ABB04277	370 aa
5-Aminolevulinato sintase	1e -51	EU073062	540 pb	<i>Sepia officinalis</i>	AAD20808	603 aa
Proteína S2 da subunidade ribossomal 40S	2e-23	EU108718	188 pb	<i>Ictalurus punctatus</i>	AAK95183	277 aa
Similar a proteína ribossomal L18a	1e-20	EU108719	208 pb	<i>Branchiostoma belcheri</i>	AAN52374	176 aa
Similar a Asparaginil tRNA sintetase	2e-94	EU108715	548 pb	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_609948	558 aa
Proteína ligante de ácidos graxos	1e-09	EU069496	391 pb	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_491928	136 aa
Similar ao carreador de soluto da família 27	1e-08	EU108714	218 pb	<i>Canis familiaris</i>	XP_531894	913 aa
Motivo alfa estéril com domínio 8	3e-36	EU108712	548 pb	<i>Mus musculus</i>	NP_080559	478 aa
Similar à proteína PHD finger	5e -33	EU108713	577 pb	<i>Canis familiaris</i>	XP_867023	1955 aa
Similar à proteína C8orf1(hT41)	1e-42	EU108711	578 pb	<i>Pan troglodytes</i>	XP_528185	549 aa
Gene homólogo da família RAS	1e-12	EU108717	172 pb	<i>Rattus norvegicus</i>	AAH61760	205 aa

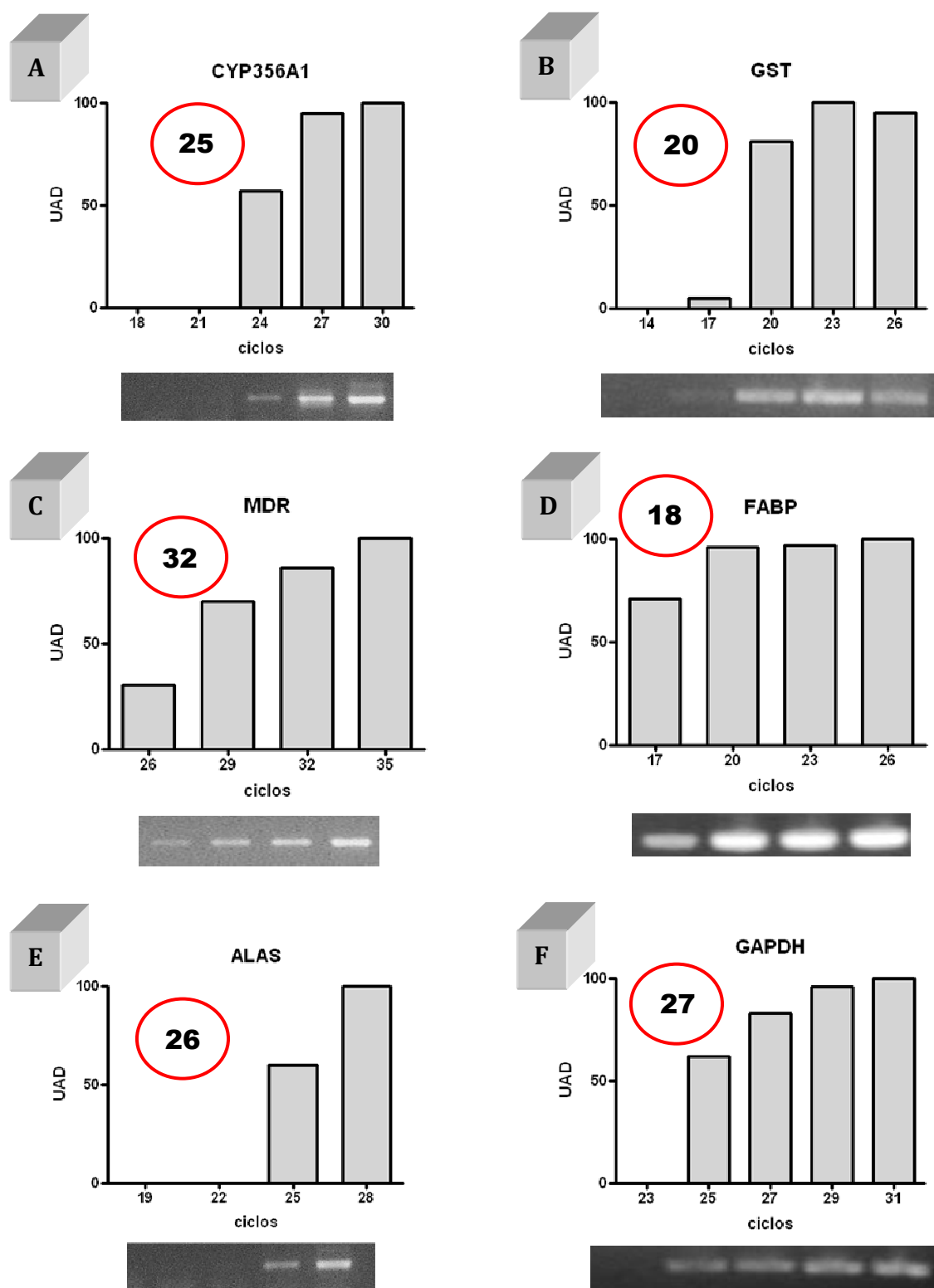
\* número de acesso e tamanho das sequências depositadas pelo nosso grupo de pesquisa para *Crassostrea gigas*; \*\* número de acesso e tamanho da sequência da espécie mais próxima.



#### 4.5 Análise da expressão gênica diferencial em aquários

Para confirmação da indução da expressão pela exposição ao esgoto, foram escolhidos os genes associados à biotransformação de fase I (*CYP356A1*), fase II (*GSTO*) e fase III (*MDR*), ligação e transporte de ácidos graxos e compostos lipofílicos (*FABP*) e síntese do grupo heme (*ALAS*). Para normalização da expressão desses genes foi utilizado o gene *GAPDH*. Com o *software* Primer3 foram desenhados iniciadores para a amplificação das cópias destes genes (Tabela 1).

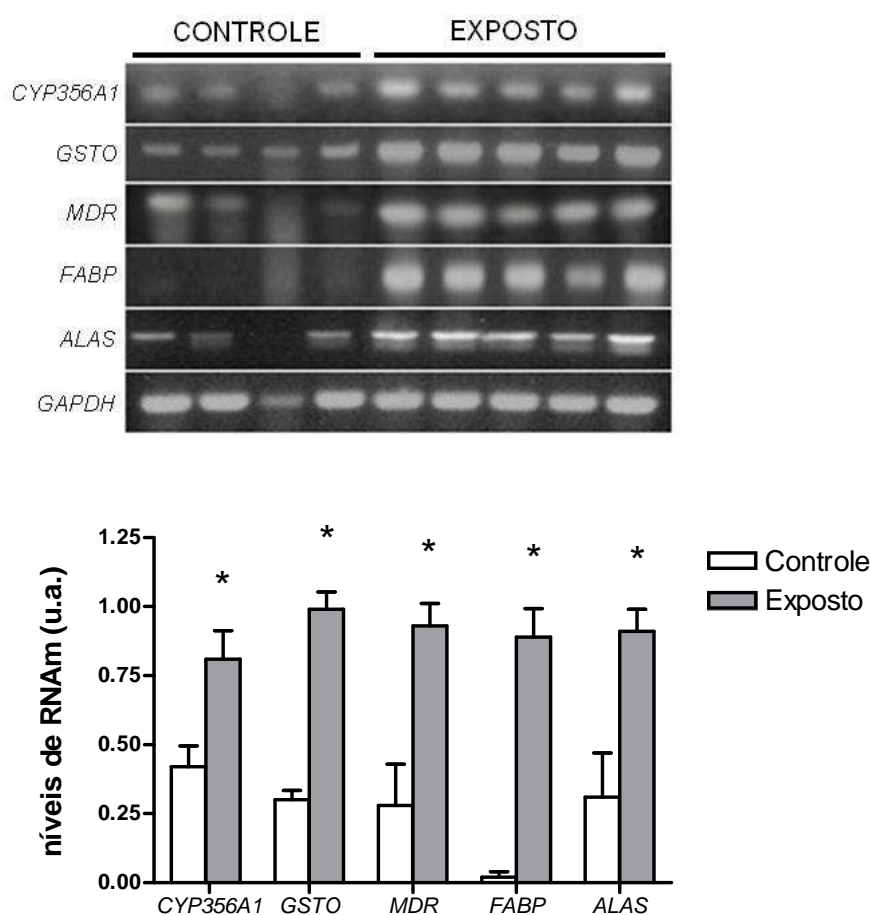
Após o desenho dos iniciadores foi realizada a padronização das condições de PCR com as curvas de ciclos, de modo a identificar a região exponencial das curvas. Foram realizadas curvas de ciclos para os 5 genes investigados e para o gene normalizador (Figura 11).



**Figura 11:** Padronização do número de ciclos para identificação da fase exponencial em que foram realizadas as reações de RT-PCR em brânquias de *Crassostrea gigas* nos experimentos de exposição ao esgoto em aquários. A - *CYP356A1*, 25 ciclos; B - *GSTO*, 20 ciclos; C - *MDR*, 32 ciclos; D - *FABP*, 18 ciclos; E - *ALAS*, 26 ciclos e F - *GAPDH*, 27 ciclos.

O número de ciclos da reação de PCR definido para cada gene foi: 25 ciclos para *CYP356A1*; 20 ciclos para *GSTO*; 32 ciclos para *MDR*; 18 ciclos para *FABP*; 26 ciclos para *ALAS* e 27 ciclos para *GAPDH* (Figura 11).

Uma vez determinadas as condições ideais das reações de PCR, a interferência da exposição das ostras a 33% de esgoto doméstico não tratado por 48 h foi investigada por RT-PCR semiquantitativo com iniciadores específicos para os genes *CYP356A1*; *GSTO*; *MDR*; *FABP* e *ALAS*, normalizados pela expressão do gene *GAPDH* (Figura 12).



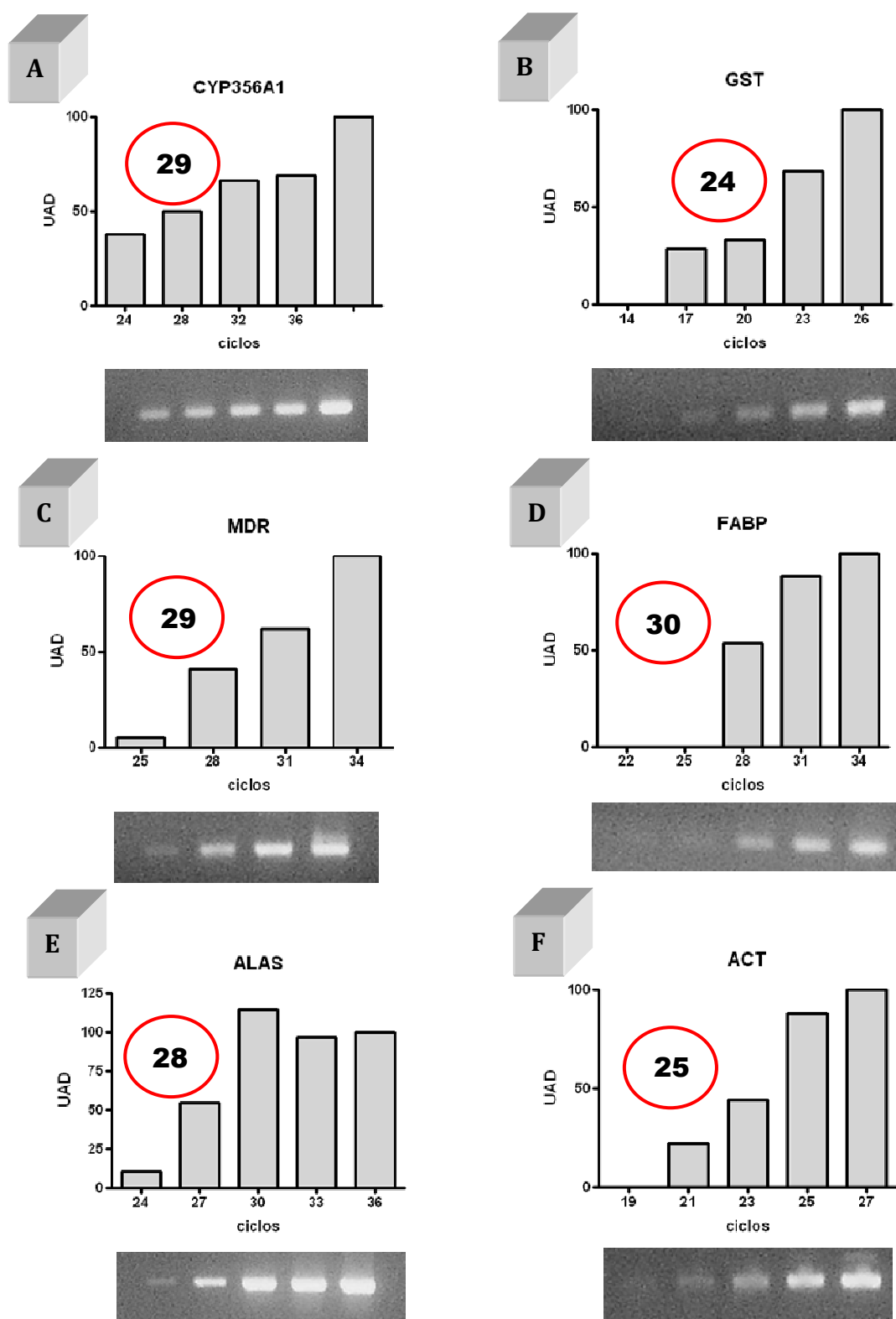
**Figura 12:** Expressão dos genes do Citocromo P450 (*CYP356A1*), Glutathione S-transferase classe ômega (*GSTO*), Proteína de resistência a múltiplas drogas (*MDR*), Proteína ligante de ácidos graxos (*FABP*) e Amilolevulinato sintase (*ALAS*) em brânquias de *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico não tratado diluído 33% por 48 h. As reações de RT-PCR semi-quantitativo foram

realizadas com a mesma quantidade de cDNA (1,2 µg obtido a partir do RNA total extraído das brânquias. O gene Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) foi usado como normalizador. (a) eletroforese em gel de agarose dos produtos das reações de RT-PCR. Grupo controle (não exposto) (n=4) e grupo exposto (n=5). (b) quantidade de transcritos de *CYP356A1*, *GSTO*, *MDR*, *FABP* e *ALAS* em relação aos transcritos de *GAPDH*. Valores representam média  $\pm$  desvio padrão de 4 animais no grupo controle e 5 no grupo exposto. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,02$ ).

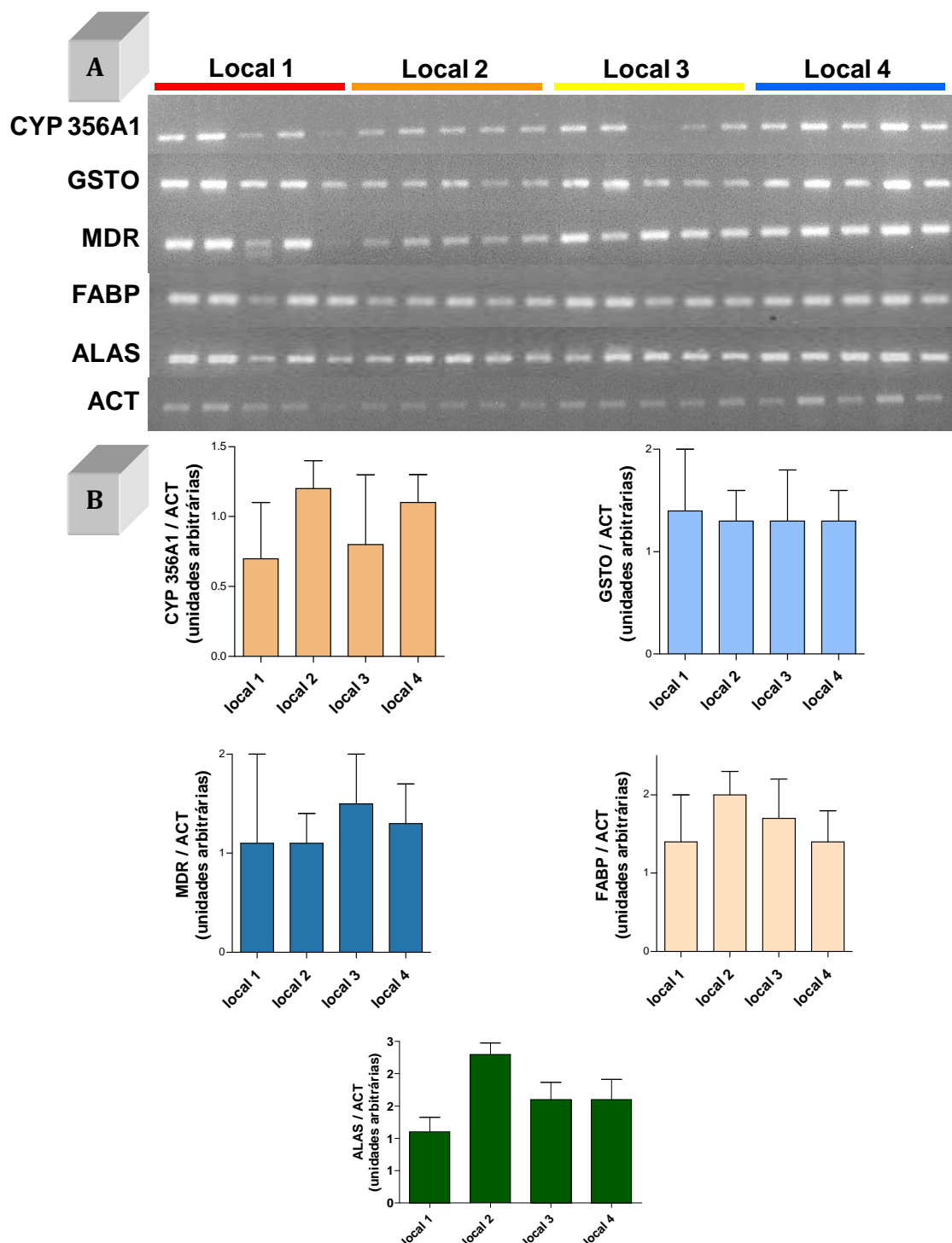
A quantidade de transcritos nas amostras de brânquias de ostras expostas ao esgoto doméstico foi significativamente maior do que nas ostras do grupo controle para todos os genes analisados (Figura 12 A e B). Os níveis de expressão foram 1,9; 3,3; 3,3; 43,6 e 2,9 vezes maiores no grupo exposto do que no grupo controle para *CYP356A1*, *GSTO*, *MDR*, *FABP* e *ALAS* respectivamente.

#### **4.6 Análise da expressão gênica diferencial *in situ***

Ao iniciar as reações de PCR para analisar a expressão gênica nas amostras de campo foi necessário realizar uma nova padronização do número de ciclos de forma a comparar a expressão dos genes na sua fase exponencial de amplificação. Conforme já foi comentado isso foi necessário porque o kit de PCR utilizado foi substituído por outro de fabricante diferente. Este procedimento foi realizado para as amostras de brânquias e de glândula digestiva das ostras (Figuras 13 e 15).

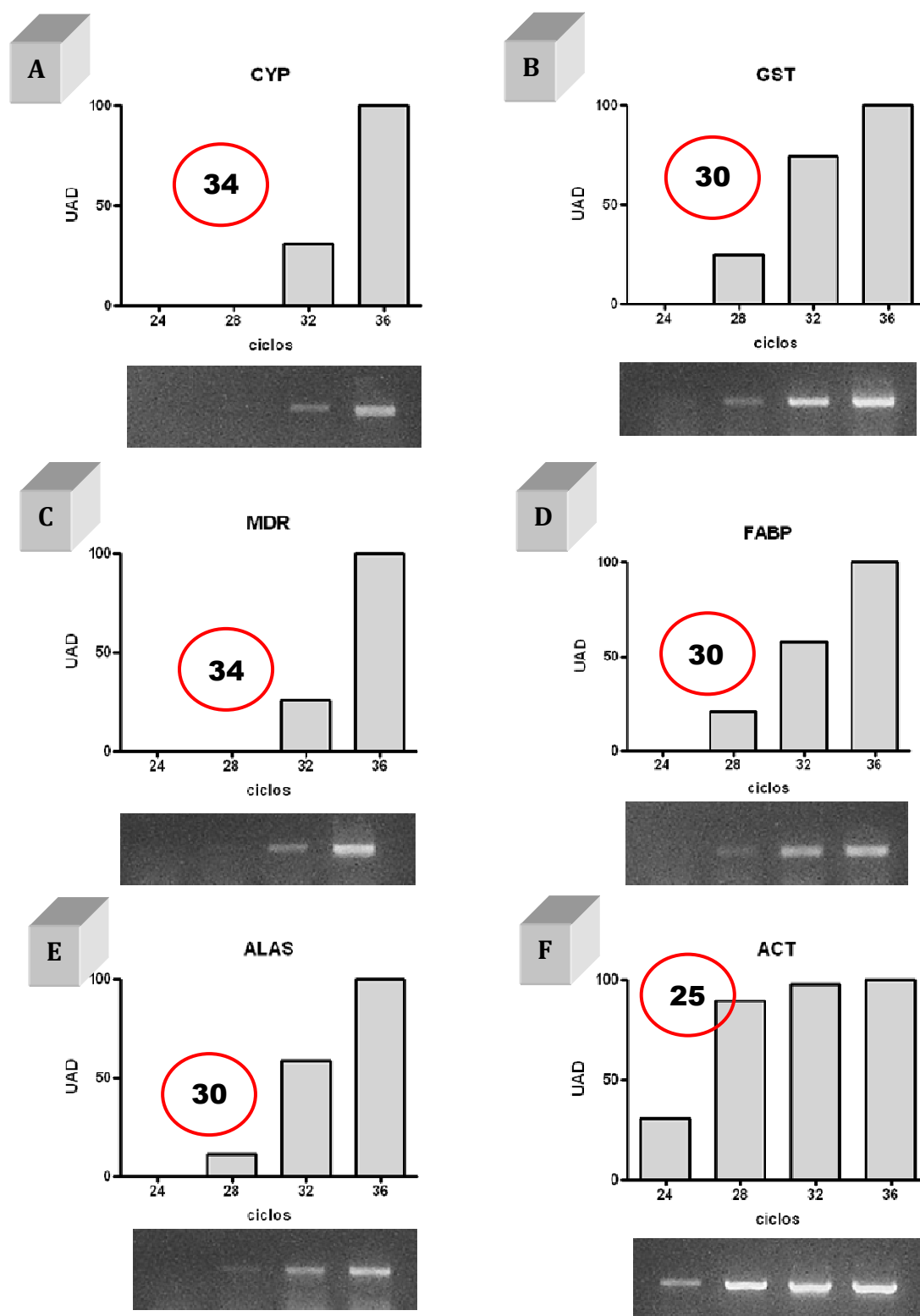


**Figura 13:** Curva do número de ciclos para identificação da fase exponencial em que foram realizadas as reações de RT-PCR em brânquias de *Crassostrea gigas* nos experimentos de exposição ao esgoto *in situ*. A - CYP356A1 29 ciclos, B – GSTO 24 ciclos, C – MDR 29 ciclos, D – FABP 30 ciclos, E – ALAS 28 ciclos e F – Actina 25 ciclos.



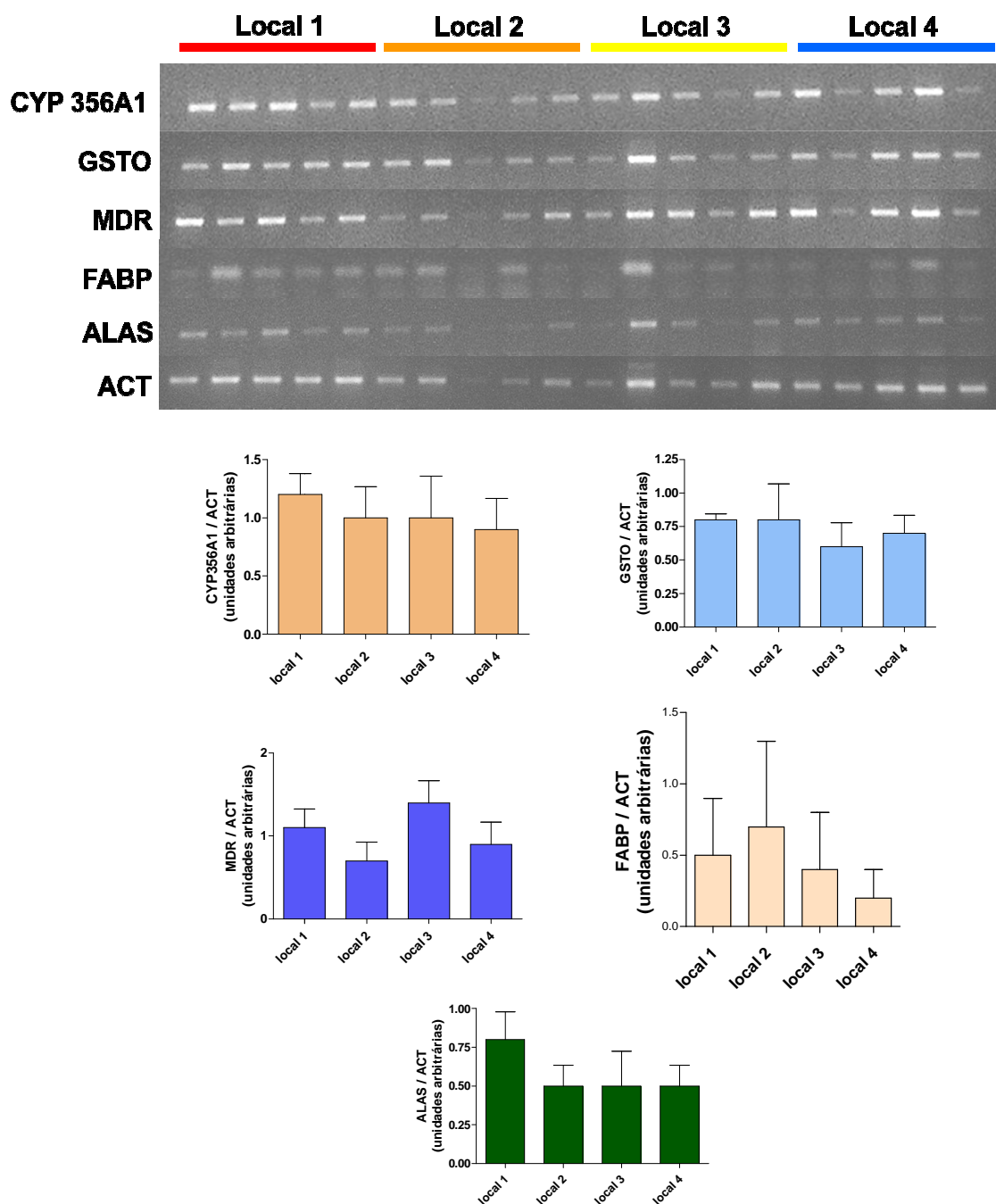
**Figura 14:** Expressão dos genes citocromo P450 (*CYP356A1*), proteína ligante de ácidos graxos (*FABP*), glutathione S-transferase classe omega (*GSTO*), proteína de resistência a múltiplas drogas (*MDR*) e aminolevulinato sintase (*ALAS*) por PCR semi-quantitativo em brânquias de ostras ( $n=5$ ) dos locais 1, 2, 3 e 4. O gene da actina (*ACT*) foi empregado como normalizador. A – gel de agarose 1,2% TAE 1x; B – densitometria do resultado da eletroforese.

Nenhuma alteração na expressão destes genes na brânquia das ostras expostas por 15 dias nos diferentes locais de exposição foi observada (Figura 14). Além da alta variabilidade existente dentro de cada grupo o gene normalizador não apresentou expressão consistente em todos os organismos dos diferentes grupos. Resultados semelhantes foram obtidos na glândula digestiva (Figura 16). As ostras mantidas no local 1 apresentaram uma maior quantidade de transcritos dos genes *CYP356A1*, *GST*, *MDR*, *FABP*, *ALAS*, e também do gene normalizador (*ACT*) (Figura 16 A).



**Figura 15:** Curva do número de ciclos para identificação da fase exponencial em que foram realizadas as reações de RT-PCR em glândula digestiva de *Crassostrea gigas* nos experimentos de exposição ao esgoto *in situ*. A - CYP356A1 34 ciclos, B – GSTO 30 ciclos, C – MDR 34 ciclos, D – FABP 30 ciclos, E – ALAS 30 ciclos e F – Actina 25 ciclos.





**Figura 16:** Expressão dos genes citocromo P450 (*CYP356A1*), proteína ligante de ácidos graxos (*FABP*), glutathione S-transferase classe omega (*GSTO*), proteína de resistência a múltiplas drogas (*MDR*) e aminolevulinato sintase (*ALAS*) por PCR semi-quantitativo em glândula digestiva de ostras (n=5) dos pontos 1, 2, 3 and 4. O gene da actina (*ACT*) foi empregado como normalizador. A – gel de agarose 1,2% TAE 1x; B – densitometria do resultado da eletroforese.

## 5 Discussão

### 5.1 Fatores Abióticos e Análises Químicas

A principal causa de contaminação crônica dos ecossistemas marinhos e estuarinos ao redor do mundo é o lançamento de esgoto doméstico em águas superficiais (Walker *et al.*, 2001). A maioria das cidades não possui instalações apropriadas para coleta, tratamento e lançamento dos seus efluentes e aquelas em que as estações de tratamento estão presentes muitas vezes convivem com problemas de sobrefluxo, com desvio do excedente para o ecossistema sem o tratamento adequado (Eganhouse & Sherblom, 2001; Zabel *et al.*, 2001). No Brasil a situação é agravada pelo fato de importantes cidades litorâneas como Fortaleza, Salvador, Belém, Vitória, Niterói e Rio de Janeiro lançarem seus efluentes diretamente no mar através de emissários submarinos (Abessa *et al.*, 2005). A contaminação por esgoto é normalmente associada com a presença de microorganismos patogênicos e/ou com o aumento da matéria orgânica no ecossistema, sendo o mesmo inclusive citado como fonte de nutrientes para o crescimento de vegetais em áreas de baixa densidade populacional (Vaillant *et al.*, 2003). Entretanto, nos aglomerados urbanos a composição do esgoto reflete os hábitos de vida da população e com frequência novos tipos de contaminantes são criados e lançados no ambiente. Petrovic e colaboradores (2003) chamam a atenção para uma classe de contaminantes emergentes derivados de atividades cotidianas, que não necessitam ser persistentes para causarem dano, visto que são continuamente inseridos no ambiente. Entre esses compostos destacam-se os medicamentos humanos e veterinários, produtos de higiene pessoal, limpeza doméstica, surfactantes e resíduos de surfactantes, derivados de óleo e plástico e aditivos industriais diversos. Muitos desses contaminantes atuam como desreguladores endócrinos interferindo no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e podem comprometer o sucesso reprodutivo de vertebrados aquáticos (Schlenk *et al.*, 2002; Tilton *et al.*, 2002). Uma vez que as estações de tratamento de efluentes não são concebidas para eliminar essas classes de contaminantes, os mesmos podem ser encontrados até mesmo em corpos de água que recebem efluentes já tratados (Stackelberg *et al.*, 2004). O controle dessa contaminação é

importante por questões ecológicas e de saúde pública, contudo enquanto a avaliação de risco dos contaminantes orgânicos normalmente é baseada nas concentrações detectadas através de métodos de química analítica e de ensaios de toxicidade com compostos isolados, no ambiente a toxicidade do esgoto é refletida pela somatória das respostas dos organismos às misturas complexas de contaminantes (Wang *et al.*, 2003).

Uma forma de se avaliar os efeitos destas misturas complexas é através da análise dos mecanismos de resposta biológica que são ativados nos organismos.

Neste trabalho, a amostra coletada na estação de tratamento Insular de Florianópolis era composta de um esgoto doméstico não tratado, caracterizado pelo odor oleoso e desagradável. A coloração cinza clara era característica de um esgoto recente (Al Shammiri, 2004; Katsoyiannis e Samara, 2007). Os valores elevados de coliformes e demanda química e bioquímica de oxigênio estavam semelhantes aos descritos para esgoto doméstico não tratado em outras regiões do planeta (Tabela 3) (Vaillant *et al.*, 2003; Hench *et al.*, 2003; Marttinen *et al.*, 2003).

As ostras utilizadas nos experimentos de exposição ao esgoto, provenientes do cultivo experimental da UFSC (praia de Sambaqui, Florianópolis) foram produzidas a partir de uma mesma larvicultura. Os organismos do experimento em aquários estavam com um alto índice de condição, pois apresentavam as gônadas preenchidas, o que facilitou a identificação do sexo por microscopia (Figura 7A). O IC é normalmente utilizado como indicador do estado de saúde dos organismos, podendo ser afetado pela presença de contaminantes diversos, de modo que índices semelhantes indicam estados de saúde similares (Domingos *et al.*, 2007). Nos experimentos de exposição ao esgoto doméstico em aquários e também no experimento *in situ* o IC não variou significativamente entre os grupos, mostrando a homogeneidade das amostras (Figura 7A e B). Outros trabalhos com bivalves analisaram índices diferentes como o índice de condição corporal ( $Body\ condition = peso / (comprimento)^3 * 100$ ) (Quiroz *et al.*, 2007) ou o índice gônado-somático (peso da gônada / peso tecidos moles) (Yeats *et al.*, 2008), entretanto esses índices não se aplicam a *C. gigas* no primeiro caso devido à

forma irregular da concha, o que descaracteriza o comprimento como uma medida padrão, e no segundo caso devido as gônadas se desenvolverem sobre o corpo do animal, o que dificulta sua separação e dissecação.

A investigação da expressão gênica diferencial ocorreu inicialmente nas brânquias por vários fatores. As brânquias de moluscos bivalves possuem uma grande área superficial, são os primeiros órgãos a entrarem em contato com o contaminante e apresentam um contato muito intenso com o meio, pois servem para alimentação e respiração (Figura 5) (Contardo-Jara e Wiegand, 2008). Além disso, trabalhos com biomarcadores detectaram alta atividade da GST, hsp70 e MXR em brânquias de moluscos (Fitzpatrick *et al.*, 2005; Piano *et al.*, 2005; Smital *et al.*, 2003). Outro órgão normalmente utilizado em análises de biomarcadores e que também foi analisado nesse trabalho é a glândula digestiva (Figura 5). Zanette e colaboradores (2008) encontraram aumento da atividade da enzima G6PDH em glândula digestiva de *C.gigas* exposta a esgoto doméstico não tratado enquanto outro trabalho analisou a peroxidação lipídica em *Elliption complanata* exposto a cádmio e encontrou aumento nas brânquias e diminuição na glândula digestiva (Gagné *et al.*, 2008).

O experimento de exposição *in situ* a esgoto doméstico foi realizado em local sabidamente contaminado. Os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos corroboram a presença da contaminação e indicam que a distribuição dos contaminantes no ecossistema sofre forte influência dos fatores abióticos. Na coleta do último dia de experimento foi registrado um aumento nos valores de turbidez, NO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>, PO<sub>4</sub> e DBO<sub>5</sub> no local 1, enquanto que o oxigênio dissolvido e a salinidade diminuíram (Figura 8). Durante a segunda semana de exposição não choveu e todas as coletas foram realizadas com a maré enchente, condições que deveriam concentrar os contaminantes na desembocadura do rio, enfatizando as diferenças do gradiente de contaminação em relação aos outros locais analisados. Entretanto o vento oeste presente no início e meio do período de exposição pode ter auxiliado a dispersão superficial dos poluentes, o que não ocorreu ao final quando o vento era nordeste. A coleta do último dia de experimento ocorreu com forte vento nordeste aliado a maré enchente, o que pode ter contribuído para concentrar o efluente próximo a desembocadura do Rio Bücheler sendo determinante para

as alterações dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos (Figura 8). Nesse dia a concentração de oxigênio dissolvido foi bem inferior ao determinado pela resolução do CONAMA (CONAMA 357) ( $L_c 1 = 3,76$ ;  $CON357 \geq 6,00$  mg/L) e o nitrogênio amoniacal e coliformes termotolerantes apresentaram valores que excedem bastante os limites máximos permitidos por essa resolução para águas de classe I (destinada à recreação de contato primário, proteção da comunidade aquática e aquicultura) ( $NH_4 L_c 1 = 1,0$ ;  $CON357 \leq 0,40$  mg/L;  $CFecais L_c 1 = 24.000/100mL$ ;  $CON357 \leq 1000/100mL$ ). Essa resolução é ainda mais restritiva quanto à densidade de coliformes termotolerantes permitida em áreas destinadas ao cultivo de moluscos bivalves para consumo humano (média geométrica de 15 amostras superior a 43/100mL, com percentil 90% inferior a 88/100mL). Esse fato é preocupante, pois no local 3 do experimento *in situ* há um cultivo de moluscos bivalves. Nesse local foram detectadas concentrações de HAPs e ABLs no sedimento e bioacumulação de BPCs e ABLs nas ostras (Tabelas 4 e 5). A concentração de coliformes termotolerantes, por sua vez, oscilou de valores não detectáveis a valores acima do permitido (Figura 8).

Alguns autores recomendam o uso de outros marcadores de água e sedimento para evidenciar o lançamento de esgotos e avaliarem a extensão desta contaminação. Entre esses marcadores estão o coprostanol, metabólito resultante da redução do colesterol pela microflora intestinal humana e os alquilbenzeno lineares (ABLs), compostos formados durante a produção industrial dos detergentes (Chaler *et al.*, 2001). O coprostanol é relativamente estável e bem preservado em condições anaeróbicas, constituindo um bom indicador de contaminação a longo prazo por esgoto doméstico (Takada & Eganhouse, 1998). Por apresentar baixa solubilidade em água normalmente se associa ao material particulado sendo posteriormente depositado no sedimento. Neste trabalho foi detectado um nível de 5,4 µg/g de coprostanol no local 1, que também apresentou concentrações detectáveis de colestanol (1,47 µg/g), estigmasterol (\*0,57 µg/g) e B-sitosterol (\*1,93 µg/g) (Tabela 4) (\*dados não apresentados). O colestanol é resultado da transformação do coprostanol, mas também pode ser sintetizado por fitoplâncton. Já o estigmasterol e o B-sitosterol são produzidos por plantas terrestres, porém são

os principais esteróides encontrados em óleos vegetais de uso doméstico, estando, portanto, presentes no esgoto. Outros estudos realizados em áreas contaminadas têm encontrado a presença de coprostanol de maneira semelhante ao observado nesse trabalho. Em sedimentos da baía de Guanabara (Rio de Janeiro) foram detectados níveis de coprostanol entre 0,33 e 40,0 µg/g (Carreira *et al.*, 2004). No sedimento do Rio Mississipi as concentrações variaram de 0,1 a 7,5 µg/g e os autores afirmam que concentrações acima de 0,01 µg/g podem ser correlacionadas com a presença de esgoto (Writer *et al.*, 1995). Alguns índices que expressam as relações entre o colesterol e seus metabólitos tem sido propostos por alguns autores para analisar o grau de contaminação por esgoto. Grimalt e colaboradores (1990) estabelecem que áreas poluídas apresentam relação coprostanol / coprostanol + colestanol (I) entre 0,07 e 1,0. Já se o sedimento apresentar uma relação coprostanol / colestanol + colesterol (II) maior que 0,06 pode ser considerado poluído (Writer *et al.*, 1995). Mudge & Norris (1997) afirmam que quando as concentrações de coprostanol ultrapassam as de colesterol ( $> 1$ ; índice III) a área é considerada poluída. O local 1 apresentou quase o dobro de coprostanol em relação a colesterol (1,83), sendo considerado contaminado por esgoto doméstico também pelos índices I e II. Com base nos dados de sedimento, o local 2 pode ser considerado poluído apenas pelo índice II, pois apresentou a maior concentração de colesterol, enquanto os locais 3 e 4 não podem ser classificados como poluídos pois não apresentaram coprostanol e colestanol em quantidades detectáveis, embora tenham sido encontrados níveis significativos de coliformes fecais nesses locais (Figura 8).

Os alquil-benzenos lineares (ABLs) ocorrem como componentes traços na formulação de detergentes e são introduzidos no esgoto a partir do uso de detergentes domésticos e industriais (Eganhouse & Sherblom, 2001). Devido à hidrofobicidade desses compostos, normalmente estão associados à matéria orgânica particulada e consequentemente podem ser encontrados no sedimento. Eganhouse e Sherblom (2001) encontraram ABLs associados à matéria orgânica particulada em áreas com sobrefluxo de estações de tratamento de esgoto. No sudoeste da Espanha foram detectados entre 293 e 1938 ng/g ps de ABLs totais no sedimento (Lara-Martin *et al.*, 2008) enquanto

na Baía de Tóquio as concentrações observadas foram entre 1000 e 3000 ng/g ps (Takada *et al.*, 1992). Na Baía norte da Ilha de Santa Catarina os valores são menores do que os citados acima, entretanto existe um gradiente de contaminação de ABLs no sedimento sendo que o local contaminado apresenta o dobro da concentração do local referência (Tabela 4). A detecção dessa classe de contaminantes por si só caracteriza a presença de esgoto doméstico na região e a presença de ABLs no sedimento corrobora os dados de coliformes e esteróides, além dos parâmetros físicos e químicos (Figura 8; Tabela 4). A relação entre os isômeros internos e externos (I/E) dos ABLs reflete o tempo de existência do esgoto, pois os isômeros externos são degradados mais rapidamente que os isômeros internos, de modo que o índice aumenta com a biodegradação da contaminação. De acordo com a literatura valores menores ou iguais a um ( $\leq 1$ ) são encontrados nos detergentes e em efluentes pós-tratamento primário, enquanto esgoto armazenado em laboratório ou que está há muito tempo no ambiente apresenta valores entre 2 e 6 (Eganhouse & Sherblom, 2001). As amostras de sedimento dos locais 1 a 4 apresentaram valores menores que um, caracterizando um esgoto recentemente introduzido no ambiente (Tabela 4). Isso acontece também com as ostras, com exceção do local 1 que apresenta I/E próximo a dois (Tabela 5). Comparando-se os níveis de ABL nas ostras coletadas no tempo zero e após 14 dias de exposição no local 1, pode ser observado que houve uma bioacumulação de cerca de 7,3 vezes. Estes níveis foram 5,4 vezes maiores do que os dos animais mantidos no local 4 (Tabela 5). Os ABLs são compostos persistentes (devido à hidrofobicidade) e dificilmente excretados.

Além destes compostos foram analisados também os níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (BPCs) e pesticidas organoclorados (DDTs). O somatório dos 36 HPAs analisados pode ser observado nas tabelas 4 e 5. As concentrações encontradas no sedimento dos quatro locais de exposição estiveram menores do que aquelas descritas por Notar e colaboradores (2001) como contaminado (<500 ng/g) ou até mesmo moderadamente contaminado (250 – 500 ng/g). Por outro lado as concentrações de HPAs analisadas nas ostras do local 1 apresentaram níveis destes contaminantes 3,3 vezes maiores do que as ostras mantidas nos locais

3 e 4, e também daquelas analisadas no tempo zero. Estes resultados mostram claramente que houve bioacumulação em níveis significativos de HPAs nos animais em apenas 14 dias de exposição. A relação HPAs leves / HPAs pesados indica que esses contaminantes do sedimento têm origem principalmente a partir da queima de combustíveis fósseis (HPAs 4 – 6 anéis; 13 – 90,7 ng/g) e não tanto a partir de óleos ou petróleo (HPAs 2 – 3 anéis; 5,3 – 39,3 ng/g), o que sugere que sua origem tem relação com os efluentes domésticos e não com o tráfego de embarcações no local.

Embora as concentrações de BPCs tenham sido encontradas em níveis detectáveis apenas no sedimento do local 3 da baía norte (Tabela 4), estas foram similares às encontradas por Castro-Jimenez e colaboradores (2008) em uma lagoa costeira do Mediterrâneo e segundo esses autores os valores são característicos de áreas urbanas moderadamente impactadas. Já nas ostras houve bioacumulação também dos BPCs (Tabela 5). Uma vez que a concentração nas ostras do local 1 é 5 vezes maior do que nas ostras analisadas no tempo zero e que esses contaminantes apresentam alta afinidade pela matéria particulada e portanto deveriam estar no sedimento, suspeita-se tratar de uma contaminação recente. Canesi e colaboradores (2003) averiguaram que 10ug/ml de BPC inibem a atividade fagocítica dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* além de reduzir drasticamente a estabilidade das membranas dos lisossomos. Embora as concentrações detectadas nas ostras sejam baixas os resultados sugerem investigação mais profunda visto tratar-se de um produto tóxico, persistente e que tem sua produção e comercialização banida por lei.

Souza e colaboradores (2008) encontraram concentrações de DDT em sedimentos da Baía de Guanabara (Rio de Janeiro) de 1,9 a 3,7 maiores do que no reservatório de Guapimirim (10,61 ng/g ps), considerado região referência. Já no estuário de Santos e São Vicente os níveis de DDT no sedimento variaram de 0,10 a 15,6 ng/g ps, sendo que dois locais não apresentaram concentração detectável (Bícego *et al.*, 2006). Tomando de base os valores da Baía de Guanabara as concentrações observadas no sedimento da baía norte são razoavelmente baixas, entretanto o sistema estuarino de Santos e São Vicente também é uma região altamente contaminada e



apresentou valores similares aos deste estudo em algumas regiões. Além disso, a presença dos maiores valores no local 1 na baía norte mostra um gradiente e indica contaminação por organoclorados nesse local (Tabela 4). Os níveis de DDT em ostras do Golfo do México variaram de 257 a 450 ng/g ps nos anos 60 e entre 11 a 18 ng/g ps no final dos anos 70 (Kenish, 1997). As ostras do local 1 apresentaram 7 ng/g ps de DDTs após o período de exposição (Tabela 5). Comparando-se estes valores com os animais do tempo zero foi observado uma bioacumulação de 2 vezes. Curiosamente as ostras que permaneceram nos locais 3 e 4 apresentaram níveis não detectáveis de DDTs, enquanto as ostras analisadas no início do experimento (tempo zero) mostraram uma pequena concentração desse composto (Tabela 5). Esse fato sugere a necessidade de uma investigação mais aprofundada, visto que esses organismos são provenientes do cultivo experimental do LMM da UFSC, bem como de um estudo sobre depuração desse contaminante.

O conjunto de dados apresentado permite afirmar que o local 1, situado junto à foz do rio Bücheller, é impactado por esgoto doméstico, visto que apresenta maiores concentrações de compostos nitrogenados e fosfatados, maior DBO<sub>5</sub> e níveis bem elevados de coliformes fecais; menor concentração de oxigênio dissolvido e maior turbidez (Figura 8); ABLs, organoclorados e esteróides no sedimento (Tabela 4). Além disso, as ostras mantidas nesse local durante 14 dias bioacumularam HPAs, BPCs, ABLs e DDTs (Tabela 5).

## **5.2 Análise da expressão gênica diferencial**

O objetivo principal deste trabalho foi o de identificar genes cuja expressão diferencial em ostras frente à exposição ao esgoto pudesse ser utilizada como biomarcador em programas de monitoramento. Para atingir tal meta, inicialmente, foi realizada uma exposição durante 48 h de ostras a uma amostra de esgoto doméstico não tratado diluído na proporção de 33% (Figura 2). A definição da concentração de esgoto utilizada neste experimento foi estabelecida em função desta ser a concentração máxima possível para que se pudesse manter a salinidade em 25 psu. Experimentos anteriores com biomarcadores bioquímicos demonstraram que a espécie *Crassostrea*

*rhizophorae* responde melhor à exposição a óleo diesel nesta salinidade (Silva *et al.*, 2005). O método escolhido foi a hibridização subtrativa supressiva (HSS), método que é caracterizado por enriquecer transcritos diferencialmente expressos presentes em baixo número de cópias, que poderiam ser mascarados pelos transcritos mais abundantes (Pardinas *et al.*, 1998). Muitos autores tem utilizado esse método para analisar genes diferencialmente expressos frente a variadas situações de estresse (Boutet *et al.*, 2004; He *et al.*, 2004; Baldwin *et al.*, 2005; Dios *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2007). A principal vantagem deste método é o PCR supressivo, realizado depois da dupla rodada de hibridizações subtrativas, onde grande quantidade do cDNA *driver* é adicionado ao cDNA *tester* e submetido a hibridização por longos períodos (8 h 1ª hibridiz.; 20 h 2ª hibridiz.) (Figura 6). A amplificação final por reação de PCR com iniciadores para os adaptadores presentes apenas nas amostras *tester* permite a identificação dos fragmentos gênicos presentes apenas nesse grupo e diminui a amplificação inespecífica (Figura 9). Além disso, o efeito supressivo elimina a maioria dos fragmentos pequenos permitindo a amplificação de moléculas a partir de um certo tamanho, o que aumenta a confiabilidade dos resultados durante a comparação das sequências com o banco de genes. Embora alguns autores argumentem que o método está sujeito a muitos resultados falso-positivos, a combinação da hibridização subtrativa com o PCR supressivo possibilita reduzir esse número a menos de 2% (Boultelle *et al.*, 2002).

Utilizando o cDNA proveniente das ostras do grupo controle como *driver* e do grupo exposto como *tester* foram obtidos 61 clones considerados como tendo a expressão induzida pela exposição, dos quais 15 foram identificados (Tabela 6). Entre esses, estão presentes genes relacionados a diferentes aspectos do metabolismo como maquinaria traducional, metabolismo aeróbico, família de transportadores e proteínas nucleares, além de genes responsáveis por mecanismos de biotransformação de xenobióticos.

Um dos genes identificados que foi ativado após a exposição ao esgoto pertence a Asparaginil – tRNAsintetase (Tabela 6). A enzima Asparaginil-tRNAsintetase, uma aminoacil-tRNAsintetase (ARS) de classe IIb, é responsável pela ligação do aminoácido asparagina a seu respectivo tRNA,

através do acoplamento do grupo aminoacil à hidroxila 3' do tRNA (Park *et al.*, 2005). De acordo com Park e colaboradores (2005), as ARS e as proteínas multi-funcionais de interação à ARS (AIMPs), estão associadas a uma variedade de funções além de seu papel na maquinaria de tradução. Entre essas funções destaca-se a transcrição, tradução, *splicing*, inflamação, angiogênese e apoptose (ARS) além de atuar como regulador da proliferação celular e no reparo de DNA (AIMPs). Assim, a indução desta ARS poderia estar relacionada a um aumento na síntese protéica em geral ou a alguma das funções citadas acima. Corroborando a primeira hipótese, a expressão dos genes das proteínas ribossomais L18a e S2 também foi induzida na brânquia das ostras expostas a esgoto doméstico (Tabela 6). Enquanto a proteína S2 auxilia a estabilização da estrutura terciária da subunidade menor (*small*) do ribossomo a proteína L18a está associada à subunidade maior (*large*). De maneira similar, Boutet e colaboradores (2004) observaram *C. gigas* expostas a hidrocarbonetos uma indução na expressão do gene de outra ARS, a Arginil-tRNAsintetase e de algumas proteínas ribossomais (Boutet *et al.*, 2004).

O gene da proteína ligante de ácidos graxos (*fatty acid binding protein* – *FABP*) foi um dos clones mais redundantes. Esta pertence a uma família de proteínas transportadoras de baixo peso molecular (~14kDa) que se ligam não covalentemente a moléculas hidrofóbicas, principalmente ácidos graxos (Esteves & Ehrlich, 2005). A principal função destas proteínas é o transporte de ácidos graxos da membrana plasmática para vários compartimentos celulares (Hittel & Storey, 2001). Entretanto, o mecanismo de captação dos ácidos graxos e transporte através do citoplasma ainda não foram completamente elucidados (Esteves & Ehrlich, 2005). Em fígado de camundongos a FABP tem sido proposta como limitante para a oxidação de ácidos graxos de cadeia longa e para modulação do receptor ativado de proliferação peroxisomal  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), um fator de transcrição que determina a capacidade de oxidação de ácidos graxos (Erol *et al.*, 2004). A expressão do gene da FABP, associado ao gene do co-transportador de sódio e glicose (SGLT) responsável pela entrada de glicose na célula, foi induzida em ostras de uma linhagem geneticamente resistente ao fenômeno da mortalidade em massa de verão (Huvet *et al.*, 2004). De acordo com Velkov e colaboradores (2005) existe forte evidência de

que o sub-tipo L-FABP, identificado originalmente no fígado de vertebrados, esteja envolvido na mediação da absorção e metabolismo de xenobióticos. A FABP transporta uma variedade de compostos hidrofóbicos além dos ácidos graxos, desde moléculas endógenas como o grupo heme, ácidos biliares e eicosanóides, até drogas exógenas e poluentes ambientais. Além disso, a alta concentração de FABP em hepatócitos e enterócitos (~3-6% de todas as proteínas citoplasmáticas) excede muito a concentração de ácidos graxos disponíveis, o que sugere que a indução da expressão do gene *FABP* nas ostras expostas ao esgoto (Figura 12) pode estar relacionada tanto à absorção e metabolismo de xenobióticos diretamente, como a uma maior demanda energética do metabolismo devido à situação de estresse químico enfrentado.

Enquanto a primeira hipótese pode ser corroborada pela indução dos genes *CYP356A1* (citocromo P450 isoforma 356A1), *GSTO* (glutathione S-transferase classe ômega) e *MDR* (*multi drug resistance* – proteína de resistência a múltiplas drogas) (Tabela 6; Figura 12), proteínas responsáveis pela biotransformação de fases I, II e III dos xenobióticos (Stegeman & Hahn, 1984; Sheehan *et al.*, 2001; Bard, 2000), a última é reforçada pela indução de cDNAs correspondentes a genes como o da enzima Acil Coenzima A Oxidase e da Oxidase Alternativa (Tabela 6). A enzima Acil Coenzima A Oxidase está envolvida no primeiro passo da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos de cadeia muito longa, que ocorre quase exclusivamente nos peroxissomos e é caracterizada pela geração de espécies reativas de oxigênio (Ngo *et al.*, 2003). A Oxidase Alternativa por sua vez é responsável pela transferência direta de elétrons da ubiquinona para o oxigênio, na cadeia de elétrons mitocondrial, gerando um sistema alternativo de transporte de elétrons que contribui menos para a geração de ATP, mas está associado à geração de calor e à redução da formação de espécies reativas de oxigênio (Tanton *et al.*, 2003). Desse modo, para atender uma maior demanda de energia metabólica necessária para ativação dos mecanismos de biotransformação, os organismos expostos aos contaminantes poderiam ativar a via da oxidação dos ácidos graxos de cadeia muito longa nos peroxissomos, gerando uma maior quantidade de espécies reativas de oxigênio. A via da Oxidase Alternativa na mitocôndria poderia ser então ativada em resposta ao aumento no estresse oxidativo.

Uma das maiores e funcionalmente diversas famílias de proteínas é a família de citocromos P450. As enzimas associadas ao P450 são relacionadas com biotransformação de xenobióticos, síntese e degradação de hormônios, estresse oxidativo e homeostase, entre outros processos (Stegeman & Hahn, 1984). São as principais e mais importantes enzimas oxidativas de biotransformação de contaminantes lipofílicos em termos de versatilidade catalítica (Guengerich, 1987). De acordo com Livingstone (1998) todos os animais possuem um grupo de enzimas de biotransformação de xenobióticos normalmente presente em níveis mais elevados no fígado ou órgão análogo. O papel dessas enzimas é converter xenobióticos orgânicos lipossolúveis hidrofóbicos em metabólitos hidrossolúveis excretáveis. As enzimas de fase I são responsáveis por introduzir ou modificar um grupamento funcional no xenobiótico, que poderá ser ligado a uma molécula polar maior por uma enzima de conjugação de fase II. Boutet e colaboradores (2004) encontraram indução da expressão de duas isoformas de P450 (*CYP3A4* e *CYP1A1-like*) em *C. gigas* expostas a hidrocarbonetos. A transcrição de *CYP3A4* é induzida por muitos compostos naturais e xenobióticos, enquanto *CYP1A-like* é um biomarcador clássico de exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Hahn, 2002). Contrariamente, Schlenk e Buhler (1989) não detectaram *CYP1A* em *C. gigas*. A isoforma clonada e identificada no presente trabalho (Tabela 6) teve a sequência do fragmento de cDNA determinada e foi classificada como uma isoforma pertencente a uma nova sub-família (*CYP356A1*) (Toledo-Silva *et al.*, 2008). A análise filogenética demonstra uma clara relação entre essa isoforma e as subfamílias *CYP1* e *CYP17*. O trabalho de Toledo-Silva e colaboradores (2008) mostrou que a expressão de *CYP356A1* foi mais elevada no manto e na glândula digestiva. Uma vez que *CYP17* exerce um papel central no controle do metabolismo dos hormônios esteróides, regulando o fluxo dos precursores de glicocorticóides e androgênios, a indução de *CYP356A1* observada nesse trabalho poderia estar associada à metabolização de esteróides nas gônadas (manto) ou à biotransformação de xenobióticos na glândula digestiva. Halm e colaboradores (2003) afirmam que o papel central que o P450c17 exerce na produção de esteróides sexuais o caracteriza como alvo potencial para compostos desreguladores endócrinos. A indução da

expressão de *CYP356A1* foi acompanhada da indução do gene *5-Aminolevulinato sintase (ALAS)* (Figura 12), que codifica a enzima responsável pelo passo limitante na rota de biossíntese do grupamento heme, presente nos citocromos, hemoglobina, catalase e que regula a expressão de vários genes em células eucariontes (Fujiware *et al.*, 2006). A indução de *ALAS* poderia, dessa forma, suprir uma demanda por grupamento heme causada pelo aumento na síntese de P450.

As GSTs são enzimas de biotransformação de fase II responsáveis pela conjugação de substratos lipofílicos com o tripeptídeo glutatona através da transferência do grupo tiol. A classe ômega, entretanto, é responsável pela redução do ácido dehidroascórbico e parece não ter relação funcional com as outras classes de GST, sendo associada à resposta celular ao estresse oxidativo (Board *et al.*, 2000). A enzima atua como uma tiol-transferase dependente de glutatona, removendo adutos S-tiol que algumas proteínas formam com a glutatona e cisteína em resposta ao estresse oxidativo (Sheehan *et al.*, 2001). Além disso, essa isoforma regula os receptores rianodina responsáveis pela homeostase do cálcio e participantes de vários processos celulares cruciais. Existem evidências de que as GSTOs poderiam proteger a célula da apoptose dependente do cálcio intracelular, através da inibição dos receptores rianodina (Sheehan *et al.*, 2001; Burg *et al.*, 2006). Boutet e colaboradores (2004) encontraram uma forte indução do gene *GSTO* em ostras *C. gigas* expostas a hidrocarbonetos, enquanto o gene de outra enzima de biotransformação de fase II, a sulfotransferase, foi reprimido. Nossos resultados mostram uma indução na expressão de *GSTO* pela exposição ao esgoto (Figura 12), que pode estar ocorrendo em resposta ao estresse oxidativo gerado pela biotransformação dos xenobióticos.

O sistema MDR/MXR (*multi xenobiotic resistance*) é bem caracterizado em mexilhões e foi descrito para a ostra *C. gigas* (Minier *et al.*, 2002). O gene MDR-1 de humanos codifica a glicoproteína-P (P-gp), proteína transmembrana de 170 kDa responsável pelo transporte ativo de drogas e xenobióticos para fora do ambiente celular (Vaalburg *et al.*, 2005). A P-gp faz parte da superfamília de proteínas transmembrana transportadoras, conhecidas como transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). Muitos compostos servem como

substratos para a P-gp, sendo que a maioria deles tende a ser compostos naturais moderadamente hidrofóbicos e planares, que podem ser substratos ou metabólitos das enzimas de biotransformação (Bard, 2000). A ação conjunta da P-gp e do citocromo P450 em organismos aquáticos foi revisada por Bard (2000). Este estudo mostra que as isoformas CYP1A e CYP3A e a P-gp podem apresentar uma co-indução ou uma redução inversa e que este comportamento depende da espécie, tecido e sexo do organismo. Deste modo a P-gp e os CYPs podem ter papel complementar na metabolização e transporte dos xenobióticos, podendo atuar em conjunto ou não. Os resultados deste trabalho mostram que tanto *MDR* quanto *CYP356A1* tiveram sua expressão induzida pela exposição ao esgoto doméstico não tratado nas brânquias de *C. gigas* (Figura 12). Uma vez que os metabólitos do citocromo P450 podem servir de substrato para a P-gp, sugere-se que essa co-indução esteja relacionada ao aumento da biotransformação dos xenobióticos pelo CYP356A1 e posterior transporte para fora da célula pela P-gp. Essa biotransformação de fase I gera espécies reativas de oxigênio, o que por sua vez levaria a um aumento na expressão do *GSTO* em resposta ao estresse oxidativo estabelecido.

A ativação de diferentes vias metabólicas em resposta aos contaminantes do esgoto certamente envolve proteínas de sinalização, que por sua vez dependem dos domínios de interação proteína-proteína e proteína-ácido nucléico para funcionar.

O gene do motivo alfa estéril com domínio 8 (*Sterile alfa motif – SAM*), que também aparece entre os que tiveram a expressão induzida (Tabela 6), codifica os domínios SAM, que são responsáveis pela interação proteína-proteína e conforme descrito recentemente também pela interação proteína-RNA (Edwards *et al.*, 2005). Os domínios SAM ocorrem em mais de 1000 proteínas em todos os eucariotos e algumas bactérias, estando presentes no citosol e em todas as organelas celulares onde participam de processos biológicos variados interagindo com proteínas responsáveis por repressão traducional, apoptose, remodelamento da cromatina, sinalização pelo receptor tirosina quinase e via ubiquitina proteossomo, entre outros (Kim & Bowie, 2003). A indução da expressão desse gene nas ostras expostas ao esgoto pode estar associada a qualquer um desses processos, sendo que há

evidências sugerindo que os domínios SAM poderiam estar envolvidos também na ligação aos lipídeos de membrana (Barrera *et al.*, 2003). Outro motivo estrutural associado com interação proteína-proteína induzido nas ostras expostas ao esgoto é o *PHD finger* (Tabela 6). Este domínio está presente em proteínas nucleares que interagem modificando a estrutura da cromatina e sua similaridade com os domínios em anel tem sugerido também a participação dos domínios *PHD finger* na mediação da ubiquitinação através da interação com a ubiquitina-ligase (Brenz, 2006). Além destes genes, também foi induzida a expressão dos genes similar à proteína C8orf1, associado à meiose e maturação de gametas (Tauchi *et al.*, 1999), similar ao carreador de solutos da família 27 e o gene homólogo da família *RAS* (Tabela 6). Esse último gene codifica uma proteína similar às Rho GTPases (Rho = Ras homologous), que ligam ciclicamente à GTP alternando entre os estado ativo / GTP-ligado e inativo / GDP-ligado (Ridley, 2001). Essas proteínas agem principalmente sobre quinases que exercem papéis chave na modulação de uma ampla gama de processos celulares como proliferação, apoptose, migração e polarização celulares, transporte através das membranas, rearranjo do citoesqueleto e regulação transcricional (Sallas-Vidal *et al.*, 2005).

Entre os genes identificados como diferencialmente expressos após exposição das ostras ao esgoto, cinco foram selecionados para confirmação da indução da expressão por RT-PCR semi-quantitativo com iniciadores específicos, em organismos individuais, com a finalidade de utilização como biomarcadores. Esses genes são os responsáveis por mecanismos de biotransformação de xenobióticos de fase I (*CYP P450 356A1*), fase II (*GSTO*) e fase III (*MDR*), síntese do grupo heme (*ALAS*) e ligação e transporte de ácidos graxos (*FABP*).

Todos os cinco genes analisados por RT-PCR semiquantitativo na brânquia das ostras apresentaram um aumento significativo na sua expressão após exposição ao esgoto não tratado em aquários ( $p < 0,02$ ) (Figura 12). Por outro lado esse aumento não foi observado quando as ostras foram expostas *in situ* durante 14 dias a um local contaminado por esgoto doméstico, quando foi observada uma grande variabilidade individual dentro de cada grupo (Figuras 14 e 16). Uma típica célula de mamífero contém entre 10-30 pg de RNAtotal,



sendo que o RNAm corresponde a uma fração de 1-5% desse valor, dependendo do estado fisiológico da célula. Essa fração pode conter cerca de 12.000 transcritos diferentes em uma única célula, alguns deles são mais comuns enquanto outros estão presentes em baixo número de cópias, representando aproximadamente 0,01% do *pool* de RNAm (Alberts *et al.*, 2002). Dessa forma a preservação e estabilização do RNA durante o processamento da amostra é de fundamental importância, pois mudanças na expressão gênica podem ocorrer devido à degradação específica e inespecífica do RNA bem como à indução da transcrição. A princípio a variabilidade observada no experimento de campo não está relacionada à estabilização do RNAm, visto que todas as amostras foram imediatamente armazenadas em solução para preservação de RNA (*RNAlater*). De acordo com o fabricante durante o armazenamento do tecido nessa solução o RNA celular permanece íntegro, mesmo em elevadas temperaturas, o que garante a confiabilidade dos resultados da análise de expressão gênica (Oligotex Handbook - Qiagen). A variabilidade observada dentro de um mesmo grupo no experimento de campo deve estar relacionada a diferenças individuais e poderia ser eliminada com a realização de *pools* de amostras ao invés da análise de cada organismo em separado.

As principais diferenças entre os dois experimentos foram a concentração de esgoto e o tempo de exposição. A indução da expressão de um gene é seguida da transcrição do RNAm, que pode ocorrer dentro de algumas horas, enquanto a síntese e maturação funcional da proteína pode levar mais tempo (Pal & Mitra, 2005). No experimento em aquários as ostras ficaram expostas ao esgoto por apenas 48 h, enquanto no ambiente as mesmas permaneceram em contato com a contaminação por 14 dias. A expressão dos genes do receptor de estrógeno (*ER*), vitelogenina (*Vtg*) e proteína da zona radiata (*Zrp*) foi analisada em peixes após injeção de nonilfenol (Yadatie *et al.*, 1999). Esse trabalho mostrou que os níveis máximos de RNAm relativos ao *ER* foram obtidos após 2 dias, retornando aos níveis de controle no dia 7, sendo esse aumento seguido pela indução da expressão dos genes *Vtg* e *Zrp* e síntese das respectivas proteínas, também após 7 dias. Os autores sugerem que o *ER* promova a síntese de outros fatores de transcrição

ou modificações na cromatina, que por sua vez teriam um efeito secundário induzindo a expressão de genes como *Vtg* e *Zrp*. Tanguy e colaboradores (2005) analisaram a expressão do gene da glutamina sintase (*GSII*) em *C. gigas* expostas a pesticidas e hidrocarbonetos. Enquanto na exposição à 0,1% da fração hidrossolúvel de combustível doméstico o aumento da quantidade de RNAm do gene *GCII* ocorreu após 7 dias retornando aos níveis do controle após 21 dias, quando expostas a 2 g/L de glifosato ou a uma mistura de atrazina (2 g/L), diuron (0,5 g/L) e isoproturon (1 g/L) os níveis de RNAm começam a aumentar somente após 14 dias permanecendo altos por até 30 dias. Já a expressão do gene aspartato aminotransferase (*AST*) em *C. gigas* exposta aos mesmos hidrocarbonetos aumentou após 7 dias permanecendo alta por até 21 dias, enquanto na exposição à hipóxia foi registrado aumento após 7 dias retornando aos níveis basais depois de 14 dias (Boutet *et al.*, 2005). Todos esses dados mostram que há diferenças quanto ao tempo de resposta na indução da expressão dos genes, mas pode-se observar um padrão geral onde ocorre primeiro a transcrição do RNAm, seguido do aumento da quantidade e atividade da proteína enquanto os níveis de RNAm retornam ao basal. Resultados não publicados de nosso grupo mostraram que em *C. rhizophorae* a expressão do gene da catalase foi induzida após 24 h de exposição ao local contaminado por esgoto, retornando aos níveis encontrados no local referência após 48 h, enquanto a atividade enzimática iniciou após 48 h e se manteve alta por 7 e 14 dias. Uma vez que os genes investigados apresentaram um aumento significativo na sua expressão após 48 h de exposição ao esgoto em aquários, suspeita-se que após 14 dias no ambiente contaminado os níveis de RNAm tenham voltado ao basal, enquanto as proteínas já sintetizadas continuaram atuando.

Outro motivo para que a indução da expressão dos genes não tenha sido detectada no experimento *in situ* é a concentração de contaminantes. No experimento em aquários a quantidade de esgoto não tratado adicionado à água marinha foi a máxima possível para que a salinidade não baixasse mais que 25 psu (33% de esgoto). Já no experimento *in situ* a concentração de contaminantes certamente foi menor que 33%. Na análise de genes biomarcadores em *C. gigas* expostas a contaminantes isolados a concentração

de xenobióticos adicionada geralmente é menor. Tanguy e colaboradores (2005) analisaram a expressão do gene *GSII* em *C. gigas* após a adição de 0,1% de uma mistura de hidrocarbonetos, 2 g/L de glifosato e atrazina, 1 g/L de isoproturon ou 0,5 g/L de diuron. Já a expressão do gene *AST* em *C. gigas* foi analisada após adição de 0,1% de uma mistura de hidrocarbonetos, 2 µg/L de glifosato e atrazina, 1 µg/L de isoproturon ou 0,5 µg/L de diuron (Boutet *et al.*, 2005). No experimento *in situ* as concentrações dos contaminantes na água não foram determinadas, porém as análises químicas detectaram bioacumulação de diferentes contaminantes orgânicos nas ostras que permaneceram por 14 dias no local 1, comprovando a existência de contaminação na água (Tabela 5). Esse fato sugere que a ausência de diferenças na expressão dos genes no experimento *in situ* deve-se ao tempo de exposição considerado longo para análises moleculares e não à baixa concentração de contaminantes na água.

Os experimentos de exposição das ostras ao esgoto no laboratório e no ambiente apresentaram resultados diferentes, pois foram realizados com *designs* diferentes (concentração do contaminante e tempo de exposição). No primeiro caso o objetivo foi expor as ostras a um estresse extremo para identificar quais genes tem sua expressão induzida podendo ser utilizado como biomarcador. Para tal finalidade a maior concentração possível de contaminante foi utilizada, o que induziu a expressão diferencial de 61 genes, 15 dos quais foram identificados (Tabela 6). Nas mesmas condições experimentais os cinco genes escolhidos para confirmação da indução apresentaram resultados expressivos após as 48 horas de exposição (Figura 12). Já no experimento de campo, quando o objetivo foi o de investigar o comportamento dos genes biomarcadores em uma situação real, sujeita a interferência dos fatores abióticos, a concentração de esgoto na água certamente foi menor além de estar sujeita a interferência da ação dos ventos, correntes, temperatura, salinidade e demais variantes. Para tentar garantir uma combinação de fatores ambientais que proporcionassem uma maior situação de estresse no ambiente de estudo, optou-se por aumentar o período de exposição para 14 dias. Embora os dados mostrem que essa combinação de fatores realmente ocorreu no final da última semana (Figura 8), parece que

nesse momento as ostras já estavam com suas enzimas de biotransformação sintetizadas. Esses resultados indicam que experimentos subseqüentes de análise da expressão gênica devem ser realizados com um tempo de exposição menor, conforme foi feito no experimento em aquários (Figuras 12, 14 e 16).

A correta interpretação dos resultados da expressão diferencial de genes, por si só representa um desafio à estatística convencional, visto sofrer interferência de vários fatores e usualmente dispor de poucas repetições nos experimentos. Além disso, as análises de variância não consideram a interação entre os genes, sendo um gene que não alcançou significância estatística na diferença entre os grupos ainda pode ter importância preditiva, quando acompanhado por alterações na expressão de outros genes (Maggioli *et al.*, 2006). Os resultados analisados não avaliam diretamente a expressão gênica, independentemente do método escolhido (microarray, Northern blot, SAGE ou PCR em tempo real) o que é estimado é a abundância de RNAm, através da intensidade de fluorescência, intensidade da banda ou Ct, e mesmo nesses casos cada método apresenta suas limitações e tendências (Quackenbush, 2006). No presente trabalho um dos problemas enfrentados teve relação com o gene constitutivo. Inicialmente o gene da actina (*ACT*) se apresentou como diferencialmente expresso, tendo sua expressão induzida pela exposição ao esgoto, e foi escolhido o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) como constitutivo. Entretanto experimentos subseqüentes não confirmaram essa indução da expressão do gene da actina, sendo o caso caracterizado como falso positivo. Quando foi realizado o experimento de campo os iniciadores desenhados para *GAPDH* não funcionaram e foi utilizado *ACT* como normalizador, embora este tenha apresentado muita variação entre os indivíduos de um mesmo grupo e entre os diferentes grupos, o que também ocorreu com os demais genes investigados (Figuras 14 e 16). Rhodes e van Beneden (1997) analisaram a expressão do gene da proteína ribossomal S9 em *Mya arenaria* e verificaram queda acentuada na expressão após o período de desova em ambos os sexos, enquanto o gene da B-actina foi expresso em níveis bem baixos, com um aparente aumento no período pós-desova. O gene S9 apresentou também indução da expressão em células neoplásicas, o que

sugere um aumento na síntese protéica para dar suporte ao aumento do número de células. A expressão dos genes *S9* e *B-actina* foi normalizada pelo gene do RNAríbssomal 18S, que por sua vez também apresentou variação entre os indivíduos. A escolha do gene constitutivo para normalizar a expressão de outro gene que tenha sido alterado pelo tratamento deve priorizar genes que tenham mantido seu padrão de expressão independentemente do estresse gerado. Dessa forma a procura de um bom gene normalizador é por vezes dificultosa e normalmente opta-se pela actina ou um gene de RNAríbssomal. Entretanto os resultados desse trabalho mostram que essa nem sempre é a melhor opção e que a escolha do gene constitutivo deve ser realizada com cautela.

Esse trabalho mostrou que a técnica de hibridização subtrativa supressiva é adequada para identificação de genes diferencialmente expressos em situações de estresse, embora a aplicação destes genes como biomarcadores necessite ser melhor investigada através de experimentos de campo com menor tempo de exposição. Foi confirmada a existência de um gradiente de contaminação a partir do local 1 em direção ao local 4 na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina e levantada uma suspeita de contaminação no local referência e no cultivo do LMM, UFSC. Além disso, as ostras expostas ao esgoto doméstico no ambiente bioacumularam HPAs, BPCs, ABLs e DDTs.

## 6 Conclusões

A partir dos resultados deste trabalho pode-se concluir que:

- a hibridização subtrativa supressiva é um método adequado para identificação de genes diferencialmente expressos em duas populações de RNAm;
- a exposição das ostras a uma alta concentração de esgoto doméstico não tratado induziu a expressão de genes associados a diferentes vias do metabolismo;
- na presença dos contaminantes do esgoto a ostra *Crassostrea gigas* ativou os mecanismos de biotransformação de xenobióticos;
- a desembocadura do Rio Bücheller na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina é uma região contaminada por esgoto doméstico;
- ostras expostas a locais contaminados por esgoto bioacumularam ABLs, BPCs, HAP e DDT;
- a utilização dos genes *CYP356A1*, *GSTO*, *MDR*, *ALAS* e *FABP* como biomarcadores de contaminação por esgoto em *C. gigas* deve ser precedida por investigação através de experimento no ambiente com um menor período de exposição.

## 7 Refêrencias Bibliográficas

- ABESSA, D.M.S.; CARR, R.S.; RACHID, B.R.F.; SOUSA, E.C.P.M.; HORTELANI, M.A. & SARKIS, J.E. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine Pollution Bulletin**, 50, 875-885. 2005.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4<sup>th</sup> Ed. Garland Science. New York. 2002.
- ANDERSEN, L.; GOTO-KAZETO, R.; TRANT, J.M.; NASH, J.P.; KORSGAARD, B. & BJERREGAARD, P. Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**. Vol. 76, No. 3-4, 343-352. 2006.
- AKAISHI, F.M.; ST-JEAN, S.D.; BISHAY, F.; CLARKE, J.; RABITTO, I.S. & RIBEIRO, C.A.O. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. **Aquatic Toxicology**. Vol. 82, No. 1, 1-14. 2007.
- ALMEIDA, E.A.; BAINY, A.C.D.; MEDEIROS, M.H.G. & DI MASCIO, P. Effects of trace metal and exposure to air on serotonin and dopamine levels in tissues of the mussel *Perna perna*. **Marine Pollution Bulletin**. 46, 1485-1490. 2003.
- AL-SHAMIRI, M. **Desalination**, 170, 1-13. 2004.
- BALDWIN, W.S.; ROLING, J.A.; PETERSON, S. & CHAPMAN, L.M. Effects of nonylphenol on hepatic testosterone metabolism and the expression of acute phase proteins in winter flounder (*Pleuronectes americanus*): Comparison to the effects of Saint John's Wort. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. 140, 87-96. 2005.
- BARD, S.M. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**. 48, 357-389. 2000.
- BARRERA, F.N., *et al.* Binding of the C-terminal SAM domain of human p73 to lipid membranes. **Journal of Biological Chemistry**. 2003.
- BÍCEGO, M.C.; TANIGUCHI, S.; YOGUI, G.T.; MONTONE, R.C.; SILVA, D.A.M.; LOURENÇO, R.A.; MARTINS, C.C.; SASAKI, S.T.; PELLIZARI, P.H. & WEBER, R.R. Assessment of contamination by polychlorinated biphenyls and aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of the

- Santos and São Vicente Estuary System, São Paulo, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, 52, 1804-1816. 2006.
- BIENZ, M. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. **Trends in Biochemical Sciences**. Vol.31, No.1, 35-40. 2006.
- BOARD, F.G.; COGGAN, M.; CHELVANAYAGAM, G.; EASTEAL, S.; JERMIIN, L.S.; SCHULTE, G.K.; DANLEY, D.E.; HOTH, L.R.; GRIFFOR, M.C.; KAMATH, A.V.; ROSNER, M.H.; CHRUNYK, B.A.; PERREGAUX, D.E.; GABEL, C.A.; GEOGHEGAN, C.A. & PANDIT, J. Identification, characterization and crystal structure of the omega class glutathione transferases. **The Journal of Biological Biochemistry**, v.275, n.32, 24798-24806. 2000.
- BULTELE, F.; PANCHOUT, M.; LEBOULENGER, F. & DANGER, J.M. Identification of differentially expressed genes in *Dreissena polymorpha* exposed to contaminants. **Marine Environmental Research**. 54, 385-389. 2002.
- BOUTET, I.; MEISTERTZHEIM, A.; TANGUY, A.; THÉBAULT, M.T. & MORAGA, D. Molecular characterization and expression of the gene encoding aspartate aminotransferase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to environmental stressors. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. 140, 69-78. 2005.
- BOUTET, I.; TANGUY, A. & MORAGA, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene**. 329, 147-157. 2004.
- BRULLE, F.; COCQUERELLE, C.; MITTA, G.; CASTRIC, V.; DOUAY, F.; LEPRÊTER, A. & VANDENBULCKE, F. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. **Developmental and Comparative Immunology**. Vol. 32, No. 12, 1441-1453. 2008.
- BURG, D.; RIEPSAAME, J.; PONT, C.; MULDER, G. & VAN DE WATER, B. Peptide-bond modified glutathione conjugate analogs modulate GSTp function in GSH-conjugation, drug sensitivity and JNK signaling. **Biochemical Pharmacology**. Vol. 71, No. 3, 268-277. 2006.
- CAMERON, K.; MADRAMOOTOO, C.; CROLLA, A. & KINSLEY, C. Pollutant removal from municipal sewage lagoon effluents with a free-surface wetland. **Water Research**. 37, 2803-2812. 2003.



- CANESI, L.; CIACCI, C.; BETTI, M.; SCARPATO, A.; CITTERIO, B.; PRUZZO, C. & GALLO, G. Effects of PCB congeners on the immune function of *Mytilus* hemocytes: alterations of tyrosine kinase-mediated cell signaling. **Aquatic Toxicology**. 63, 293-306. 2003.
- CARREIRA, R.S.; WAGENER, A.L.R. & READMAN, J.W. Sterols as markers of sewage contamination in a tropical urban estuary (Guanabara Bay, Brazil): space-time variations. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. 60, 587-598. 2004.
- CASTRO-JIMÉNEZ, J.; DEVILLER, G.; GHIANI, M.; LOOS, R.; MARIANI, G.; SKEJO, H.; UMLAUF, G.; WOLLGAST, J.; LAUGIER, T.; HÉAS-MOISAN, K.; LÉAUTÉ, F.; MUNSCHY, C.; TIXIER, C. & TRONCZYŃSKI, J. PCDD/F and PCB multi-media ambient concentrations congener patterns and occurrence in a Mediterranean coastal lagoon (Etang de Thau, France). 2008.
- CASTRO, M.; SANTOS, M.M.; MONTEIRO, N.M. & VIEIRA, N. Measuring lysosomal stability as an effective tool for marine coastal environmental monitoring. **Marine Environmental Research**. 58, 741-745. 2004.
- CHALER, R.; SIMONEIT, B.R.T. & GRIMALT, J.O. Bile acids and sterols in urban sewage treatment plants. **Journal of Chromatography A**. 927, 155-160. 2001.
- CHATTERJEE-KISHORE, M. & WHITLEY, M.Z. From differential gene expression to differential gene function and back: Recent strategies for drug target identification and validation. **Drug Discovery Today: Technologies**. Vol. 1, No. 2, 149-156. 2004.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). 2005. Resolução Nº 357, 17 março 2005. Disponível no endereço: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>, acessado em 20 de julho de 2008 às 10:16h.
- CONTARDO-JARA, V. & WIEGAND, C. Molecular biomarkers of *Dreissena polymorpha* for evaluation of renaturation success of a formerly sewage polluted stream. **Environmental Pollution**. Vol. 155, No. 1, 182-189. 2008.
- DIOS, S.; POISA-BEIRO, L.; FIGUERAS, A. & NOVOA, B. Suppression subtraction hybridization (SSH) and macroarray techniques reveal differential gene expression profiles in brain of sea bream infected with nodavirus. **Molecular Immunology**. Vol. 44, No.9, 2195-2204. 2007.

- DOMINGOS, F.X.V.; AZEVEDO, M.; SILVA, M.D.; RANDI, M.A.F.; FREIRE, C.A.; ASSIS, H.C.S. & RIBEIRO, C.A.O. Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. **Environmental Research**. 105, 350-363. 2007.
- EDWARDS, T.A.; BUTTERWICK, J.A.; ZENG, L.; GUPTA, Y.K.; WANG, X.; WHARTON, R.P.; PALMER III, A.G. & AGGARWAL, A.K. Solution Structure of the Vts1 SAM Domain in the Presence of RNA. **Journal of Molecular Biology**. Vol. 356, No. 5, 1065-1072. 2005.
- EGANHOUSE, R.P. & SHERBLOM, P.M. Anthropogenic organic contaminants in the effluent of a combined sewer overflow: impact on Boston Harbor. **Marine Environmental Research**. 51, 51-74. 2001.
- ESTEVES, A. & EHRLICH, R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. Vol. 142, No. 3-4, 262-274. 2005.
- FINNE, E.F.; COOPER, G.A.; KOOP, B.F.; HYLLAND, K. & TOLLEFSEN, K.E. Toxicogenomic responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes exposed to model chemicals and a synthetic mixture. **Aquatic Toxicology**. 81, 293-303. 2007.
- FRANCOIS, E.; WANG, D.Y.; FULTHORPE, R.; LISS, S.N. & EDWARDS, E.A. DNA microarrays for detecting endocrine-disrupting compounds. **Biotechnology Advances**. 22, 17-26. 2003.
- FUJIWARA, T.; HARIGAE, H.; TAKAHASHI, S.; FURUYAMA, K.; NAKAJIMA O.; SUN, J.; IGARASHI, K.; YAMAMOTO, M.; SASSA, S.; KAKU, M.; SASAKI, T. Differential gene expression profiling between wild-type and ALAS2-null erythroblasts: Identification of novel heme-regulated genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 340, 105-110. 2006.
- GAGNÉ, F.; AUCLAIR, J.; TURCOTTE, P.; FOURNIER, M.; GAGNONA, C.; SAUVÉ, S. & BLAISE, C. Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. **Aquatic Toxicology**. 86, 333-340. 2008.
- GAUTHIER, F. & ARCHIBALD, F. The ecology of “fecal indicator” bacteria commonly found in pulp and paper mill water systems. **Water Research**. Vol. 35, No. 9, 2207-2218, 2001.

- GUENGERICH, F.P. **Mammalian Cytochrome P450**. Boca Raton, FL. CRC Press. 1987.
- HALL, T.A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, 95-98. 1999.
- HALM,S.; KWON,J.Y.; RAND-WEAVER,M.; SUMPTER,J.P.; POUNDS, N.; HUTCHINSON, T.H. & TYLER, C.R. Cloning and gene expression of P450 17a-hydroxylase,17,20-lyase cDNA in the gonads and brain of the fathead minnow *Pimephales promelas*. **General and Comparative Endocrinology**. 130, 256–266. 2003.
- HAHN, M.E. **Science of Total Environment**. 289, 49-69. 2002.
- HANSEN, B.H.; ALTIN, D.; NORDTUG, T. & OLSEN, A.J. Suppression subtractive hybridization library prepared from the copepod *Calanus finmarchicus* exposed to a sublethal mixture of environmental stressors. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part D**. 2, 250-256. 2007.
- HE, N.; LIU, H. & XU, X. Identification of genes involved in the response of haemocytes of *Penaeus japonicus* by suppression subtractive hybridization (SSH) following microbial challenge. **Fish & Shellfish Immunology**. 17, 121-128. 2004.
- HENCH, K.R.; BISSONNETTE, G.K.; SEXSTONE, A.J.; COLEMAN, J.G.; GARBUTT, K. & SKOUSEN, J.G. Fate of physical, chemical, and microbial contaminants in domestic wastewater following treatment by small constructed wetlands. **Water Research**. 37, 921-927. 2003.
- HITTEL, D. & STOREY, K.B. Differential expression of adipose- and heart-type fatty acid binding proteins<sup>1</sup> in hibernating ground squirrels. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1522, 238-243. 2001.
- HOFFMANN, J.L.; TORONTALI, S.P.; THOMASON, R.G.; LEE, D.M.; BRILL, J.L.; PRICE, B.B.; CARR, G.J. & VERSTEEG, D.J. Hepatic gene expression profiling using Genechips in zebrafish exposed to 17-ethynylestradiol. **Aquatic Toxicology**. 79, 233-246. 2006.
- HSU, J.C.; CHANG, J.Y. & WANG, T. Simultaneous confidence intervals for differential gene expressions. **Journal of Statistical Planning and Inference**. 136, 2182-2196. 2006.

- HUGGET, R.; KIMERIE, R.A.; MEHRIE, Jr., P.M. & BERGMAN, H.L. **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress.** Boca Raton, Lewis Publish. 347p. 1992.
- HUVET, A.; HERPIN, A.; DE´GREMONT L.; LABREUCHE, Y.; SAMAIN, J.F. & CUNNINGHAM, C. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. **Gene.** 343, 211-220. 2004.
- JU, Z.; WELLS, M.C.; HEATER, S.J. & WALTER, R.B. Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.** Vol. 145, No. 1, 134-144. 2006.
- KATSOYIANNIS, A., & SAMARA, C. **Journal of Hazardous Materials.** 141, 614-621. 2007
- KENNISH, M.J. **Estuarine and marine pollution.** Boca Raton: CRC Press. 524p. 1997.
- KIM, C.A. & BOWIE, J.U. SAM domains: uniform structure, diversity of function. **Trends in Biochemical Sciences.** Vol. 28, No. 12, 625-628. 2003.
- LARA-MARTÍN, P.A.; GÓMEZ-PARRA, A. & GONZÁLEZ-MAZO, E. Sources, transport and reactivity of anionic and non-ionic surfactants in several aquatic ecosystems in SW Spain: a comparative study. **Environmental Pollution.** 156, 36-45. 2008.
- LETTIERI, T. Recent Applications of DNA Microarray Technology to Toxicology and Ecotoxicology. **Environmental Health Perspectives.** 114, 4-9. 2006.
- LEUSCH, F.D.L.; VAN DEN HEUVEL, M.R.; CHAPMAN, H.F.; GOONERATNE, S.R.; ERIKSSON, A.M.E. & TREMBLAY, L.A. Development of methods for extraction and in vitro quantification of estrogenic and androgenic activity of wastewater samples. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.** 143, 117-126. 2006.
- LIAO, V.H.C. & FREEDMAN, J.H. Differential display analysis of gene expression in invertebrates. **Cellular and Molecular Life Sciences.** 59, 1256-1263. 2002.
- LIVINGSTONE, D.R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by

invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. 120, 43-49. 1998.

MAGGIOLI, J.; HOOVER, A. & WENG, L. Toxicogenomic analysis methods for predictive toxicology. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. 53, 31-37. 2006.

MARTTINEN, S.K.; KETTUNEN, R.H. & RINTALA, J.A. Occurrence and removal of organic pollutants in sewages and landfill leachates. **The Science of the Total Environment**. 301, 1-12. 2003.

MINIER, C.; LELONG, C.; DJEMEL, N.; RODET, F.; TUTUNDJIAN, R.; FAVREL, P.; MATHIEU, M. & LEBOULENGER, F. Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Marine Environmental Research**. 54, 455–459. 2002.

MUDGE, S.M. & NORRIS, C.E. Lipid biomarkers in the Conwy Estuary (North Wales, U.K.): a comparison between fatty alcohols and sterols. **Marine Chemistry**. 57, 61-84. 1997.

MUNKITTRICK, K.R. & VAN DER KRAAK, G., Appropriate Uses of Physiological Techniques for Endocrine Studies. **Environmental Toxicology and Risk Assessment**. 8, 95-118. 1999.

NGO, S.N.T.; MCKINNON, R.A. & STUPANS, I. Identification and cloning of two forms of liver peroxisomal fatty Acyl CoA Oxidase from the koala (*Phascolarctos cinereus*). **Gene**. 309, 91-99. 2003.

PAL, D. & MITRA, A.K. MDR- and CYP3A4-mediated drug–herbal interactions. **Life Sciences**. Vol. 78, No. 18, 2131-2145. 2005.

PARDINAS, J.R.; COMBATES, N.J.; PROUTY, S.M.; STENN, K.S. & PARIMOO, S. Differential Subtraction Display: a unified approach for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. **Analytical Biochemistry**. 257, 161-168. 1998.

PARK, S.G.; EWALT, K.L. & KIM, S. Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: new perspectives on housekeepers. **Trends in Biochemical Sciences**. Vol. 30, No. 10, 569–574. 2005.

PENÃ, S.C. & POCSIDIO, G.N. Influence of Copper on the Feeding Rate, Growth and Reproduction of the Golden Apple Snail, *Pomacea*

- canaliculata* Lamarck. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 79, 606–608. 2007.
- PENTEADO, J.P.; EL SEOUD, O.A. & CARVALHO, L.R.F. Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica. **Química Nova**, Vol. 29, No. 5, 1038-1046. 2006.
- PETROVIC, M.; GONZALEZ, S. & BARCELO, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**. Vol. 22, No. 10. 2003.
- PETUSHOK, N.; GABRYELAK, T.; PAŁECZ, D.; ZAVODNIK, L.; VARGA, I.S. & DEÉR, K.A. Comparative study of the xenobiotic metabolising system in the digestive gland of the bivalve molluscs in different aquatic ecosystems and in aquaria experiments. **Aquatic Toxicology**. 6, 65–72. 2002.
- PIANO, A.M.; FRANZELLITTI, S.; TINTI, F. & FABBRI, E. Sequencing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. **Gene**. Vol. 361, No. 21, 119-126. 2005.
- PINÃ, B.; CASADO, M. & QUIRÓS, L. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. **Trends in Analytical Chemistry**. Vol. 26, No. 11. 2007.
- QUACKENBUSH, J. Weighing our measures of gene expression. **Molecular Systems Biology**. 2:63. doi:10.1038/msb4100096. Published online: 14 November.2006.
- QUIRÓS, L.; PINÃ, B.; SOLÉ, M.; BLASCO, J.; LÓPEZ, M.A.; RIVA, M.C.; BARCELÓ, D. & RALDUÁ, D. Environmental monitoring by gene expression biomarkers in *Barbus graellsii*: Laboratory and field studies. **Chemosphere**. 67, 1144-1154. 2007.
- RIDLEY, A.J. Rho family proteins: coordinating cell responses. **Trends in Cell Biology**. Vol. 11, No. 12, 471-477. 2001.
- RHODES, L.D. & VAN BENEDEN, R.J. Isolation of the cDNA and characterization of mRNA expression of ribossomal protein S19 from the soft-shell clam *Mya arenaria*. **Gene**. 197, 295-304. 1997.
- SAAVEDRA, C. & BACHÈRE, E. Bivalve genomics. **Aquaculture**. Vol. 256, No. 1-4. 2006.

- SALAS-VIDAL, E.; MEIJER, A.H.; CHENG, X. & SPAINK, H.P. Genomic annotation and expression analysis of the zebrafish Rho small GTPase family during development and bacterial infection. **Genomics**. 86, 25-37. 2005.
- SCHLENK, D. & BUHLER, D.R. Xenobiotic biotransformation in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, Vol. 94, No. 2, 469-475. 1989.
- SCHLENK, D.; FURNES, B.; ZHOU, X. & DEBUSK, B.C. Cloning and sequencing of cytochrome P450 2X1 from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Marine Environmental Research**. 54, 391–394. 2002.
- SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V.M. & DOWD, C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**. 360, 1 - 16. 2001.
- SILVA, A.Z.; ZANETTE, J.; FERREIRA, J.F.; GUZENSKI, J.; MARQUES, M.R.F. & BAINY, A.C.D. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Vol. 62, No. 3, 376-382. 2005.
- SMITAL, T.; SAUERBORN, R. & HACKENBERGER, B.K. Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the fresh water mussel *Dreissena polymorpha*. **Aquatic Toxicology**. Vol. 65, No 4, 443-465. 2003.
- SOUZA, A.S.; TORRES, J.P.M.; MEIRE, R.O.; NEVES, R.C.; COURI, M.S.; SEREJO, C.S. Organochlorine pesticides (OCs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments and crabs (*Chasmagnathus granulata*, Dana, 1851) from mangroves of Guanabara Bay, Rio de Janeiro State, Brazil. **Chemosphere** 73, 186–192. 2008.
- STACKELBERG, P.E.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; ZAUGG, S.D.; HENDERSON, A.K. & REISSMAN, D.B. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-watertreatment plant. **Science of the Total Environment**. 329, 99–113. 2004.

- TAKADA, H.; ISHIWATARI, R. & OGURA, N. Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) and linear alkylbenzenesulphonates (LAS) in Tokyo Bay sediments. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. Vol. 35, No. 2, 141-156. 1992.
- TANGUY, A.; BOUTET, I. & MORAGA, D. Molecular characterization of the glutamine synthetase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: expression study in response to xenobiotic exposure and developmental stage. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1681, 116–125. 2005.
- TANTON, L.T.; NARGANG, C.E.; KESSLER, K.E.; LI, Q. & NARGANG, F.E. Alternative oxidase expression in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**. 39, 176–190. 2003.
- TAUCHI, H.; MATSUURA, S.; ISOMURA, N.; KINJO, T.; NAKAMURA, A.; SAKAMOTO, S.; KONDO, N.; ENDO, S.; KOMATSU, K. & NAKAMURA, Y. Sequence Analysis of an 800-kb Genomic DNA Region on Chromosome 8q21 That Contains the Nijmegen Breakage Syndrome Gene NBS1. **Genomics**. v.55, n.2, 242-247. 1999.
- TILTON, F.; BENSON, W.H. & SCHLENK, D. Evaluation of estrogenic activity from a municipal wastewater treatment plant with predominantly domestic input. **Aquatic Toxicology**. 61, 211–224. 2002.
- TOLEDO-SILVA, G.; SIEBERT, M.N.; MEDEIROS, I.D.; SINCERO, T.C.M.; MORAES, M.O.; GOLDSTONE, J.V. & BAINY, A.C.D., Cloning a new cytochrome P450 isoform (*CYP356A1*) from oyster *Crassostrea gigas*, **Marine Environmental Research**. Vol. 66, No. 1, 15-18. 2008.
- VAALEBURG, W.; HENDRIKSE, N.H.; ELSINGA, P.H.; BART, J. & VAN WAARDE, A. P-glycoprotein activity and biological response. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 207, 257–260. 2005.
- VAILLANT, N.; MONNET, F.; SALLANON, H.; COUDRET, A. & HITMI, A. Treatment of domestic wastewater by a hydroponic NFT system. **Chemosphere**. 50, 121–129. 2003.
- VELKOV, T.; CHUANG, S.; PRANKERD, R.; SAKELLARIS, H.; PORTER, C.J.H. & SCANLON, M.J. An improved method for the purification of rat liver-type fatty acid binding protein from *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**. 44, 23–31. 2005.



- WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M. & PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis, 2<sup>a</sup> ed, Londres, p.309. 2001.
- WANG, C.; WANG, Y.; KIEFER, F.; YEDILER, A.; WANG, Z. & KETTRUP, A. Ecotoxicological and chemical characterization of selected treatment process effluents of municipal sewage treatment plant. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 56, 211–217. 2003.
- WRITER, J.H.; LEENHEER, J.A.; BARBER, L.B.; AMY, G.L. & CHAPRA, S.C. Sewage contamination in the upper mississippi river as measured by the fecal sterol, coprostanol. **Water Research**. Vol. 29, No. 6, 1427–1436. 1995.
- YADETIE, F.; ARUKWE, A.; GOKSØYR, A. & MALE, R. Induction of hepatic estrogen receptor in juvenile Atlantic salmon in vivo by the environmental estrogen, 4-nonylphenol. **The Science of the Total Environment**. 233, 201–210. 1999.
- YEATS, P.; GAGNÉ, F. & HELLOU, J. Body burden of contaminants and biological effects in mussels: An integrated approach. **Environment International**. 34, 254–264. 2008.
- ZABEL, T.; MILNE, I. & McKAY, G. Approaches adopted by European Union and selected Member States for the controll of urban pollution. **Urban Waters**. 3, 25-32. 2001.
- ZANETTE, J.; NUNES, F.F.; MEDEIROS, I.D.; SIEBERT, M.N.; MATTOS, J.J.; LÜCHMANN, K.H.; MELO, C.M.R. & BAINY, A.C.D. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**. 66, 196–198. 2008.

## Accepted Manuscript

Differential gene expression in oyster exposed to sewage

Igor Dias Medeiros, Marília Nardelli Siebert, Guilherme de Toledo e Silva,  
Milton Osório Moraes, Maria Risoleta Freire Marques, Afonso Celso Dias Bainy

PII: S0141-1136(08)00075-5

DOI: [10.1016/j.marenvres.2008.02.048](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.048)

Reference: MERE 3221

To appear in: *Marine Environmental Research*



Please cite this article as: Medeiros, I.D., Siebert, I.N., de Toledo e Silva, G., Moraes, M.O., Freire Marques, M.R., Dias Bainy, A.C., Differential gene expression in oyster exposed to sewage, *Marine Environmental Research* (2008), doi: [10.1016/j.marenvres.2008.02.048](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.048)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

## Differential gene expression in oyster exposed to sewage

Igor Dias Medeiros <sup>a,b</sup>, Marília Nardelli Siebert <sup>a</sup>, Guilherme de Toledo e Silva <sup>a</sup>,  
Milton Osório Moraes <sup>c</sup>, Maria Risoleta Freire Marques <sup>a</sup>, Afonso Celso Dias  
Bainy <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Campus Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil 88040-900

<sup>b</sup> Laboratório de Ciências Marinhas, Universidade do Sul de Santa Catarina, Av. Colombo Sales, 89, Laguna, SC, Brasil, 88790-000

<sup>c</sup> Laboratório de Hanseníase, Fundação Oswaldo Cruz, Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365 Manguinhos, 21045-900 - Rio de Janeiro, RJ - Brasil

### Abstract

In order to investigate the influence of domestic sewage on the gene expression of Pacific oysters *Crassostrea gigas*, Suppression Subtractive Hybridization (SSH) method was employed. Oysters were sampled at a farming area and, after 10 days of acclimation in the laboratory, were exposed to untreated domestic sewage diluted 33% for 48h. Gills of male oysters were excised for total RNA extraction. mRNA was purified and the differential gene expression was analyzed by SSH. We obtained 61 cDNA sequences but only 15 were identified, which includes Fatty Acid Binding Protein, Multidrug Resistance Protein, Omega Glutathione S-Transferase,

cytochrome P450 isoform CYP356A1, among others. The identified genes are associated with different metabolic functions like biotransformation, membrane transport, aerobic metabolism and translational machinery, evidencing the potential toxic effects elicited by these effluents.

**Keywords:** *Crassostrea gigas*; SSH; Gene expression; Sewage; Biomarker; Monitoring.

\*Corresponding author: *Email address:* bainy@mbox1.ufsc.br (A.C.D. Bainy)

Sewage discharges in marine and estuarine ecosystems are a common practice around the world. Besides the high input of organic matter, sewage may contain several kinds of persistent or non-persistent contaminants, such as pharmaceuticals, personal and home care products, surfactants, plasticizers, polycyclic aromatic hydrocarbons and trace metals, which are continuously delivered and its negative effects on the organisms must be considered (Petrovic et al., 2003). Bivalves are frequently employed in biomonitoring programs because they are filter-feeders, easy to collect and largely distributed. The areas of bivalve genomics and transcriptomics are emerging fields considering their application to aquaculture, fisheries and environmental sciences (Saavedra and Bachère, 2006). The aim of this study was to investigate differential gene expression in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* after sewage exposure, under controlled laboratory conditions, in order to identify new potential biomarkers of exposure. For this purpose, we employed suppressive subtractive hybridization (SSH).

Pacific oysters (two years old) were supplied by the oyster culture facility from the Universidade Federal de Santa Catarina and transferred to the laboratory. Individuals were kept in two 45L tanks (n=11) with aerated filtered marine water (salinity 24ppt; temperature  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ )

for a 10 days acclimation period. After that, one group of animals was exposed for 48h to untreated domestic sewage, diluted 33%. The sewage sample was collected at the influent duct of the downtown wastewater treatment plant (Florianópolis, SC, Brazil) after solid material grid removal. The light gray color as well as the physical and chemical parameters were characteristic of fresh untreated domestic sewage (BOD 360mg/L; COD 393mg/L; SS 148 mg/L) (Katsoyiannis and Samara, 2007; Al-Shammiri, 2004). A control group was kept in a tank containing filtered marine water diluted similarly in charcoal-filtered freshwater. The water was changed daily and the organisms were fed with microalgae. Likewise, the oysters were monitored daily by visual inspection to determine that they were alive and opening their valves. After the exposure period, the oysters were sacrificed, their sex was identified and the gills were excised and kept in RNAlater (Ambion) at -20°C until RNA extraction. Oyster gills from male organisms from exposed and control groups were pooled (n=5, each group) and total RNA was extracted in TRIZOL (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). PolyA mRNA was isolated using Oligotex mRNA Mini kit (Qiagen, Valencia, CA). Sample purity, mRNA concentration and integrity were checked at 260 and 280 nm and in 2% agarose gel electrophoresis. SSH was performed according to PCR Select cDNA Subtraction Kit (Clontech, Palo Alto, CA) and only the forward subtraction was performed, to identify up-regulated genes. Subtracted libraries were obtained from 2 µg mRNA of pooled gills, respectively, from exposed and control oyster groups (control group cDNA was referred to as the *driver* and the exposed group cDNA as the *tester*). Secondary (nested) PCR-amplified subtracted cDNA populations were cloned into the pGEM-T Easy Vector System and transformed into JM-109 *E. coli* cells (Promega, Madison, WI). Plasmids were extracted and purified using Perfectprep Plasmid Mini kit (Eppendorf, Hamburg). Sixty-one clones were sequenced using ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit

(PE Applied Biosystems). Deduced protein sequences were subjected to homology search through the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

From the sixty-one cDNA sequences, 15 were identified (Table 1). The data showed that different pathways of the oyster metabolism were changed after sewage exposure. Biotransformation genes, such as the new cytochrome P450 subfamily CYP356A1 (Toledo-Silva, this volume), omega glutathione S-transferase (GST-O) and multidrug resistance protein (MDR) were up-regulated in the gills of sewage exposed oysters. Besides these biomarkers of exposure, other genes belonging to the transporters family, translational machinery, aerobic metabolism, and nuclear proteins were also induced in the exposed group. One of the most redundant clones contained the cDNA of fatty acid binding protein (*FABP*). FABP are small cytosolic proteins (12 – 15 kDa) that bind non-covalently to hydrophobic ligands, mainly fatty acids. It has been suggested that the sub-type L-FABP, originally identified in vertebrate liver, is associated with xenobiotic uptake and metabolism (Velkov et al., 2005). FABP is also associated with increased fatty acid oxidation, which in turn, could provide energy required for protein synthesis and detoxification.

A subsequent study using semi-quantitative analysis showed that the expression of *CYP356A1*, *GSTO*, *MDR*, *FABP* and aminolevulinic acid synthase (*ALAS*) were induced by 1.9, 3.3, 3.3, 43.6 and 2.9-fold, respectively in the gills of oysters exposed to sewage (Medeiros et al., 2007).

The use of SSH in environmental studies allows the identification of multiple genes that are differentially expressed that can help to elucidate biochemical strategies of adaptation and survival used by mollusks exposed to toxic compounds in domestic sewage. The applicability of these genes as potential biomarkers is being investigated through field experiments before they can be adopted in environmental programs.

## Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian Council for the Scientific and Technological Development (CNPQ), Grant n. 475995/2003-1. ACDB is recipient of the CNPQ productivity fellowship. The authors would like to thank Dr. Jaime Fernando Ferreira and Dr. Claudio Manoel Rodrigues de Melo for assistance during the experiment set up, and to the CASAN (Florianopolis Wastewater Treatment Plant).

## References

- Al-Shamiri, M. (2004). *Desalination*, 170, 1-13.
- Katsoyiannis, A., and Samara, C. (2007). *Journal of Hazardous Materials*, 141, 614-621.
- Medeiros I.D., Siebert, M.N., Toledo-Silva, G., Rodrigues, T.B., Marques, M.R.F., and Bainy, A.C.D. (2007). Submitted to *Comparative Biochemistry and Physiology*.
- Petrovic, M., Gonzalez, S., and Barceló, D. (2003). *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 685 – 696.
- Saavedra, C., and Bachère, E. (2006). *Aquaculture*, 256, 1-14.
- Toledo-Silva, G., Siebert, M.N., Medeiros, I.D., Sincero, T.C.M., Moraes, M.O., Goldstone, J., et al. (2007). *Marine Environmental Research*, This issue.
- Velkov, T., Chuang, S., Prankerd, R., Sakellaris, H., Porter, C.J.H., and Scanlon, M. (2005). *Protein Expression and Purification*, 44, 23–31.

Table 1.

List of up-regulated genes in gills of oyster *Crassostrea gigas* exposed for 48 h to untreated domestic sewage

Putative match	GenBank Accession number*	Species match	Length	e-value	GenBank Accession number**
Cytochrome P450 3561A	EF645271	<i>Squalus acanthias</i>	509 aa	3e-24	AAB34256
Glutathione S-transferase omega class	-	<i>Crassostrea gigas</i>	243 aa	4e-22	CAD89618
Multi drug resistance protein	EU073425	<i>Gallus gallus</i>	1307 aa	1e-52	XP_418636
Acyl CoA oxidase similar protein	EU108716	<i>Danio rerio</i>	660 aa	1e-38	AAH83524
Alternative oxidase isoform A	EU108720	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	370 aa	1e-91	ABB04277
5-Aminolevulinate synthase	EU073062	<i>Sepia officinalis</i>	603 aa	1e-51	AAD20808
40S ribosomal protein S2	EU108718	<i>Ictalurus punctatus</i>	277 aa	2e-23	AAK95183
Ribosomal protein L18a similar protein	EU108719	<i>Branchiostoma belcheri</i>	176 aa	1e-20	AAN52374
Asparaginyl tRNA-synthetase similar protein	EU108715	<i>Drosophila melanogaster</i>	558 aa	2e-94	NP_609948
Fatty acid binding protein	EU069496	<i>Caenorhabditis elegans</i>	136 aa	1e-09	NP_491928
Solute carrier family 27 similar protein	EU108714	<i>Canis familiaris</i>	913 aa	1e-08	XP_531894
Sterile alpha motif with 8 domain	EU108712	<i>Mus musculus</i>	478 aa	3e-36	NP_080559
PHD finger similar protein	EU108713	<i>Canis familiaris</i>	1955 aa	5e-33	XP_867023
C8orf1 (hT41) similar protein	EU108711	<i>Pan troglodytes</i>	549 aa	1e-42	XP_528185
Räs homolog gene family	EU108717	<i>Rattus norvegicus</i>	205 aa	1e-12	AAH61760

\*Genbank access number deposited after this work. \*\*Genbank access number of the closest match (e-value) obtained after blasting to National Center of Biotechnology Information





Contents lists available at ScienceDirect

## Environmental Toxicology and Pharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/etap](http://www.elsevier.com/locate/etap)



### Short communication

## Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage

Igor D. Medeiros<sup>a,b</sup>, Marília N. Siebert<sup>a</sup>, Guilherme Toledo-Silva<sup>a</sup>, Thiago B. Rodrigues<sup>a</sup>,  
Maria R.F. Marques<sup>a</sup>, Afonso C.D. Bainy<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Depto. Bioquímica, CCB, UFSC, Campus Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Ciências Marinhas, UNISUL, Av. Colombo Sales 89, 88790-000 Laguna, SC, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 March 2008

Received in revised form 12 May 2008

Accepted 22 May 2008

Available online xxx

#### Keywords:

*Crassostrea gigas*

Oyster

Sewage

Biomarker

Biotransformation

### ABSTRACT

Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, were exposed to untreated sewage diluted in seawater. After 48 h of exposure, the expression of genes associated to biotransformation pathways (*CYP356A1*, *GSTO*, *MDR*, *FABP* and *ALAS*) were analyzed in gills through semi-quantitative RT-PCR. A significant induction in all genes analyzed in the sewage-exposed oysters was observed. These genes are related to phase I (*CYP356A1*), phase II (*GSTO*) and phase III (*MDR*) biotransformation systems, to the uptake and transport of hydrophobic ligands (*FABP*) and to the synthesis of prosthetic group heme (*ALAS*). The organisms were able to survive in contaminated conditions since protective mechanisms have been properly stimulated.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Domestic sewage is one of the main sources of contamination on estuarine and marine ecosystems (Abessa et al., 2005). Sewage composition is uncertain and may change according to human activities. These effluents may contain organic matter and contaminants, such as personal care products, house cleaning chemicals, etc. (Petrovic et al., 2003). The exposed organisms usually induce enzyme systems that are able to biotransform a wide range of chemicals. These enzymes play central roles in the biotransformation, metabolism and/or detoxification of xenobiotics and have been classified into three distinct phases, which act in a tightly integrated manner (Sheehan et al., 2001).

The oxidative metabolism in the phase I system is mainly mediated by cytochrome P450-dependent microsomal monooxygenase systems. Cytochrome P450 (CYP) is a hemoprotein encoded by a super family of genes present in the genomes of all phyla (Hannemann et al., 2007). Genome analysis and studies using well-characterized CYP substrates and inhibitors have allowed the identification and quantification of a growing number of different CYP isoforms (Li et al., 2007; Peters et al., 1998; Shimada, 2006).

In animals, fungi and bacteria the heme biosynthesis pathway starts with the formation of 5-aminolevulinic acid by

5-aminolevulinic synthase (ALAS; EC2.3.1.37) (Schulze et al., 2006). Heme can be a limiting factor for xenobiotic biotransformation and for other important processes since this prosthetic group is required to enzymes, such as cytochromes and catalase, and proteins, such as hemoglobin and myoglobin (Atamna, 2006; Tsiftoglou et al., 2006).

Glutathione S-transferases (GSTs; EC2.5.1.18) are associated to phase II of biotransformation systems. GSTs are a multifunctional family of mainly cytosolic enzymes which play a major role in detoxification of deleterious electrophilic xenobiotics such as herbicides, insecticides, chemical carcinogens, and other organic and inorganic environmental pollutants (Sharma et al., 2004; Sheehan et al., 2001). Based on the N-terminal amino acid sequence, antibody cross-reactivity, substrate specificity, and sensitivity to inhibitors, GSTs have been formerly classified into different classes named as alpha, beta, delta, mu, omega, pi, sigma, tau, theta and zeta (Sheehan et al., 2001). However novel classes of GST sequences have been identified in non-mammalian organisms especially in subtractive suppressive hybridization studies. One example is the GST omega class (GSTO) which has been identified among the list of up-regulated genes in oysters exposed to hydrocarbon (Boutet et al., 2004) and to domestic sewage (Medeiros et al., 2008). This GST isoform is suggested to be involved in the antioxidant defense system (Rhee et al., 2007). Under oxidative stress conditions, cellular proteins form S-thiol adducts with glutathione and cysteine, which might inactivate enzymes (Ravichandran et al., 1994). GSTOs is proposed to be involved in the reduction of this S-thiol adduct restoring biologic function.

\* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 6561; fax: +55 48 3721 9672.  
E-mail address: [bainy@mbbox1.ufsc.br](mailto:bainy@mbbox1.ufsc.br) (A.C.D. Bainy).

Systems of exporting biotransformation by-products out off cell have been described as belonging to phase III of biotransformation (Kurelec, 1992). High molecular weight membrane glycoproteins (PgP, MDRs, MRPs) belong to the ATP-binding cassette (ABC) transporter super family, which is the largest and most broadly expressed protein super family known (Leslie et al., 2005). In humans, these proteins are responsible for the active transport of a wide range of structurally and functionally diverse compounds across biological membranes, including phospholipids, ions, peptides, steroids, polysaccharides, amino acids, organic anions, bile acids, drugs and other xenobiotics (Klein et al., 1999). In invertebrates some of these proteins have conferred a multixenobiotic resistance phenotype (MXR) since they pump out a wide variety of contaminants lowering intracellular concentrations below their toxic level (Bard, 2000; Minier et al., 2002). MXR is inducible in the presence of contaminants and its wide taxonomic distribution suggests its role as a general biological defense mechanism that protects the organisms under chemical stress (Smital and Kurelec, 1997).

An integrative manner to quantify stress in an organism can be provided by the total amount of energy available for maintenance, growth and reproduction (Smolders et al., 2003). When organisms are exposed to chemical stress, part of its energy is spent during xenobiotic biotransformation. The ability of storing and mobilizing metabolic fuel, such as fatty acids may be decisive for ATP production and surviving. Fatty acid binding proteins (FABP) have an important role in this process. These cytosolic proteins bind reversibly to fatty acids and other lipids in order to regulate uptake, intracellular transport and compartmentalization of fatty acids and other hydrophobic ligands to different cellular fates (Esteves and Ehrlich, 2006).

Analysis of changes in the pattern of gene expression in organisms exposed to contaminants can be used as early warning signals to prevent subsequent episodes of mortality in the population. Through the identification of key genes important for the molecular adaptation to adverse environmental conditions, it is possible to predict the susceptibility to exposure to chemicals at individual, community and population levels. This strategy could also help to develop tools to elucidate the molecular mechanisms of toxicity of different contaminants.

Bivalves are commonly used in biomonitoring programs, because they are filter-feeders and can accumulate xenobiotics. This fact associated with its economic importance in aquaculture has caused to emerge an interest in bivalve genomics (Saavedra and Bachere, 2006). In this paper we investigate the expression of genes related with biotransformation (CYP, GST and MDR), heme biosyn-

thesis pathway (ALAS) and fatty acid metabolism (FABP) which have been previously identified in a suppressive hybridization library in oysters exposed to untreated domestic sewage (Medeiros et al., 2008).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Adult Pacific oysters *Crassostrea gigas* (average length 75 mm) from the same hatchery were sampled at an oyster experimental farming area (Laboratório de Moluscos Marinheiros, Departamento de Aquicultura, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil). The animals were cleaned and immediately transferred to the laboratory where the experiment was carried out.

### 2.2. Experimental design

Twenty-two oysters were kept into two 45-L aquaria ( $n = 11$  oysters per aquarium), containing filtered seawater (salinity 24 ppt) under constant aeration and temperature at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  for a 10-day period of acclimation. The water was renewed daily and the organisms were fed with *Chaetoceros calcitrans* at a density of  $1 \times 10^4$  cells/oyster once a day. After the acclimation period, the oysters from one aquarium were exposed to a 33% dilution of untreated domestic sewage for 48 h. Sewage was collected at the influent duct of the downtown wastewater treatment plant (Florianópolis, SC, Brazil) after solid material grid removal. The light gray color as well as the physical and chemical parameters were characteristic of fresh untreated domestic sewage, similar to the effluents which are eventually discharged on the environment (BOD 360 mg/L; COD 393 mg/L; SS 148 mg/L) (Al-Shammiri, 2004; Katsoyiannis and Samara, 2007). The other aquarium received only filtered seawater in the same dilution with freshwater in order to keep the same salinity in both aquaria (24 ppt). Seawater as well as sewage solution were changed daily. During the experiment all oysters were alive and opening valves and no mortality was observed.

After the exposure, sex identification was performed through the gonadal analysis under microscopy. For this experiment, only males were analyzed.

### 2.3. RNA extraction and cDNA synthesis

The gills were excised (control group,  $n = 4$ ; exposed group,  $n = 5$ ) and kept in RNAlater (Qiagen). RNA was extracted using a standard TRIzol procedure (Invitrogen Life Technologies) according to manufacturer's instruction. Total RNA was quantified using a spectrophotometer at 260 nm. Two micrograms of total RNA was transcribed into cDNA using Omniscript RT Kit (Qiagen). The cDNA concentration was assessed in a spectrophotometer as described above for the RNA samples.

### 2.4. Semi-quantitative RT-PCR

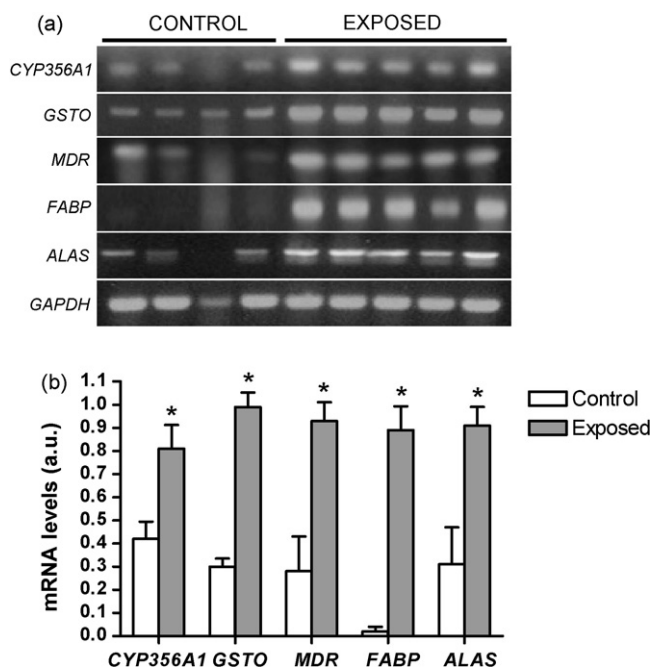
cDNA concentration was adjusted to 1.2  $\mu\text{g}$  to perform the semi-quantitative RT-PCR. A PCR kit (Biosystems Comercial, Importadora, Exportadora de Equipamentos de Laboratório, Ltda), was used for the amplification reaction using a thermocycler TGradient (Biometra). Primers for the amplification of the genes differentially expressed were designed using Primer 3 Software (Rozen and Skaletsky, 2000). The primer sequences for amplifying CYP356A1 (GenBank accession no. EF645271), ALAS (GenBank accession no. EU073062), GSTO (GenBank accession no. CB617406), MDR

**Table 1**

Primer pairs and PCR reactions used in the analysis of genes expressed in gills of *Crassostrea gigas* exposed to untreated sewage

Gene	Primers/PCR reaction	Expected size (bp)
CYP356A1	Sense: 5'CCA GAA GAA TTT GAC CCA CTT CG 3'; antisense: 5'TTT GTA ATC GGA CGG AAG CTC TAC 3'; PCR reaction: 2 min at $94^\circ\text{C}$ ; 25 cycles of $94^\circ\text{C}$ for 15 s, $51^\circ\text{C}$ for 45 s and $72^\circ\text{C}$ for 60 s	249
GSTO	Sense: 5'GGT GTA TCC CGA TAA CAA GCT GAC 3'; antisense: 5'CTG AGG GTC CAG TCG ACA TTT TT 3'; PCR reaction: 20 cycles of $94^\circ\text{C}$ for 30 s, $52^\circ\text{C}$ for 45 s and $72^\circ\text{C}$ for 60 s	362
MDR	Sense: 5'GGC AGT CAT GTT CTT TGC CTA TG 3'; antisense: 5'GCA GCC ATT GGA CAT TTA GAT CCT 3'; PCR reaction: 2 min at $94^\circ\text{C}$ ; 32 cycles of $94^\circ\text{C}$ for 30 s, $52^\circ\text{C}$ for 45 s and $72^\circ\text{C}$ for 60 s	443
FABP	Sense: 5' GTT TGA GGG AAA CTG GGA ATG C 3'; antisense: 5' TCC GTC GGA ATA TGT CAG TTT AGC 3'; PCR reaction: 2 min for $94^\circ\text{C}$ ; 5 cycles of $94^\circ\text{C}$ for 15 s decreasing $2^\circ\text{C}$ in the annealing temperature per cycle, starting at $60^\circ\text{C}$ , $72^\circ\text{C}$ for 30 s; 18 cycles of $94^\circ\text{C}$ for 15 s, $51^\circ\text{C}$ for 45 s and $72^\circ\text{C}$ for 30 s	255
ALAS	Sense: 5'AGA CCT CAC ACT CAT CCG GAC AGA CAG 3'; antisense: 5' CTT CAC TAC CAG TCT CCT CCC ACC AC 3'; PCR reaction: 2 min at $94^\circ\text{C}$ ; 25 cycles of $94^\circ\text{C}$ for 15 s, $51^\circ\text{C}$ for 45 s and $72^\circ\text{C}$ for 60 s (CYP); 26 cycles of $94^\circ\text{C}$ for 30 s, $58^\circ\text{C}$ for 30 s and $72^\circ\text{C}$ for 30 s	427
GAPDH	Sense: 5'ACT CCA AAG ACC AGA ACA TCG T 3'; antisense: 5'CAA AGC TGT CGG AAA GGT TAT C 3'; PCR reaction: 2 min at $94^\circ\text{C}$ ; 27 cycles of $94^\circ\text{C}$ for 15 s, $49^\circ\text{C}$ for 45 s and $72^\circ\text{C}$ for 60 s	275

CYP356A1: cytochrome P450 356A1; GSTO: glutathione-S-transferase, omega class; MDR: multidrug resistance protein; FABP: fatty acid binding protein; ALAS: aminolevulinic acid synthase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.



**Fig. 1.** Effect of sewage exposure on expression of the genes Cytochrome P450 (CYP356A1), glutathione-S-transferase omega class (GSTO), multidrug resistance protein (MDR), fatty-acid binding protein (FABP) and aminolevulinic acid synthase (ALAS) in gills of *Crassostrea gigas* exposed to untreated sewage diluted 33% for 48 h. Semi-quantitative RT-PCR was performed with the same amount of cDNA (1.2 µg) obtained from total RNA extracted from gills. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a housekeeping gene to normalize the data (a) agarose gel electrophoresis of the RT-PCR products. Control (non-exposed) group ( $n=4$ ) and Exposed group ( $n=5$ ). (b) Amount of CYP356A1, GSTO, MDR, FABP and ALAS transcripts relative to GAPDH transcripts. Values represent mean  $\pm$  S.D. of four animals in the control and five, on the exposed group. \*Differences statistically significant from the control ( $p < 0.02$ ).

(GenBank accession no. EU073425), FABP (GenBank accession no. EU069496) and GAPDH genes (GenBank accession no. AJ544886), as well as the expected size of their respective fragments and the PCR conditions for amplifying each gene are shown in Table 1.

The resulting PCR products were submitted to electrophoresis in a  $1 \times$  TAE/1.2% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. CYP356A1, ALAS, GSTO, MDR and FABP transcript levels were quantified with Gel Quant Software. GAPDH level was used to normalize the data since no change in the expression of this gene was observed between both groups.

## 2.5. Statistical analysis

Data were statistically compared using the Student's *t*-test. Differences were considered significant when  $P < 0.02$  was obtained.

## 3. Results

After 48 h of exposure to untreated sewage, the five oysters from the exposed group showed higher levels of expression than the control group for all the analyzed genes (Fig. 1a). Fig. 1b shows an increase of 1.9-, 3.3-, 3.3-, 43.6- and 2.9-fold in expression of CYP356A1, GSTO, MDR, FABP and ALAS genes, respectively, in the gills of *C. gigas*.

## 4. Discussion

Sewage contamination in costal ecosystems is a concerning issue worldwide, since frequently the cities do not possess proper facilities to collect, treat and dispose the sewage constantly produced, increasing the risk of microbiological and chemical contamination (Abessa et al., 2005).

Due to the importance of bivalves in biomonitoring programs, changes on their gene expression when exposed to contaminants could be used as an early warning system and help the policy-makers in environmental management process.

CYP356A1 has been recently identified and classified as member of a new CYP subfamily closely related to CYP1 and CYP17 subfamilies and is highly expressed in digestive gland, mantle and gills of *C. gigas* (Toledo-Silva et al., 2008). CYP17 subfamily is associated with steroid metabolism, while CYP1A is classically used as biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (Stegeman et al., 2001). It could be hypothesized that the elevated CYP356A1 expression in the oysters exposed to sewage might be associated to enhanced xenobiotic biotransformation and/or to the presence of endocrine disruptors, which are commonly found in domestic sewage. These compounds could interfere with steroid metabolism by mimicking steroid hormones (Quinn et al., 2004). 4-Nonylphenol, a compound usually present in sewage, which shows a strong estrogenic effect, induced about 50% the CYP3A expression in winter flounder (Baldwin et al., 2005).

Together with CYP induction, the GSTO gene, a GST isoform which belongs to the Phase II biotransformation system was significantly induced in the exposed oyster. There are some evidences that GSTO is part of the mechanism of antioxidant defense, particularly, reducing S-thiol adducts established between cellular proteins with glutathione and cysteine during oxidative stress (Rhee et al., 2007). Based on this data, we could suggest that chemicals present in the sewage might be inducing oxidative stress in the exposed organisms. GSTO gene has been previously found in the list of up-regulated genes of *C. gigas* exposed to hydrocarbons (Boutet et al., 2004).

The elevated expression of MDR in gills of the exposed oyster could be associated with the increase on CYP356A1 and GSTO, genes respectively involved in the expression of Phase I and Phase II enzymes. MDR, a gene codifying a Phase III transporter, possibly has an important role in the MXR mechanism, helping to pump out of the cell the contaminants below their toxic level (Bard, 2000; Minier et al., 2002). Ontogenetic studies have shown that the expression and activity of a MXR system in *C. gigas* start at the transition between trocophor to veliger stage (Minier et al., 2002). At this stage, the oyster has already formed all tissues, including gills, an essential organ for respiration, food selection and also xenobiotic biotransformation, which makes the MXR mechanism ecologically important in polluted areas.

FABPs are small cytosolic proteins that bind non-covalently hydrophobic ligands. The specific function of FABPs has been a challenging subject (Esteves and Ehrlich, 2006). Vertebrate FABPs are widely expressed in different tissues and are involved in energy pathways, growth and development, FA transport between membranes (Glatz and van der Vusse, 1996). However, other biological roles, such as participation on signal transduction and regulation of gene expression are being investigated (Esteves and Ehrlich, 2006). Based on the significant expression of these proteins in hepatocytes (3–6% of total protein content) that exceeds by far the fatty acids content in liver, it is suggested that some FABPs are involved in mediating the absorption and metabolism of xenobiotics (Velkov et al., 2005). There are evidences that non-fatty acid lipophilic drug molecules are capable of binding specifically to rat intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) which might increase the cytosolic solubility of these compounds and thereby facilitating drug transport from the intestinal lumen across the enterocyte to the sites of distribution and metabolism (Velkov et al., 2005). Blasting the sequence of *C. gigas* FABP identified in the present study, we obtained a significant *e*-value for I-FABP, suggesting that the 43.6-fold induction observed in the expression of this gene could be associated with the biotransformation and possibly detoxification



of lipophylic compounds absorbed during the exposure. Another hypothesis to explain such elevated induction of FABP could be related to the enhanced energy demand to cope with biosynthetic pathways and biotransformation reactions to detoxify the chemicals from the body.

Aminolevulinatase-synthase (ALAS) catalyzes the condensation of succinyl-CoA and glycine producing aminolevulinic acid, the first step in heme biosynthetic pathway (Duncan et al., 1999). This prosthetic group is essential to many important enzymes involved in the biotransformation (cytochrome P450), respiration (cytochromes, hemocyanin), antioxidant defenses (catalase, peroxidase), etc. The observed increase in the ALAS in the oysters exposed to sewage could be part of a general stress response, possibly to cope with the increased expression of biotransformation genes, such as *CYP356A1* and other hemoproteins, enabling the organisms to adapt in these stressing conditions. Recent studies carried out in vivo in knock-out animals confirmed that the ALAS induction is mediated in part by the nuclear receptors which also modulates other CYP isoforms (Fraser et al., 2003). Based on that, we could hypothesize that all these activated genes were possibly modulated by common transcriptional factors, which in turn could have been bound to different chemicals present in the sewage.

All these results show that the oysters can adapt to the presence of different chemicals present in the sewage making use of different biochemical strategies which allow them to survive in polluted areas. Our results corroborate very clearly the potential applicability of using data about the expression of genes that possess key roles in metabolism and biotransformation as early warning system for water quality monitoring using bivalves as sentinel organisms.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Jaime Fernando Ferreira and Dr. Claudio Manoel Rodrigues de Melo for assistance during the experiment set up, and to the CASAN (Florianopolis Wastewater Treatment Plant). This work was supported by the Brazilian Council for the Scientific and Technological Development (CNPQ), Grant no. 475995/2003-1. ACDB is recipient of the CNPQ productivity fellowship.

## References

- Abessa, D.M., Carr, R.S., Rachid, B.R., Sousa, E.C., Hortelani, M.A., Sarkis, J.E., 2005. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 875–885.
- Al-Shammiri, M., 2004. Hydrogen sulfide emission from the Ardiyah sewage treatment plant in Kuwait. *Desalination* 170, 1–13.
- Atamna, H., 2006. Heme binding to amyloid-beta peptide: mechanistic role in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 10, 255–266.
- Baldwin, W.S., Roling, J.A., Peterson, S., Chapman, L.M., 2005. Effects of nonylphenol on hepatic testosterone metabolism and the expression of acute phase proteins in winter flounder (*Pleuronectes americanus*): comparison to the effects of Saint John's Wort. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 140, 87–96.
- Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357–389.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, 147–157.
- Duncan, R., Faggart, M.A., Roger, A.J., Cornell, N.W., 1999. Phylogenetic analysis of the 5-aminolevulinatase synthase gene. *Mol. Biol. Evol.* 16, 383–396.
- Esteves, A., Ehrlich, R., 2006. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 142, 262–274.
- Fraser, D.J., Zumsteg, A., Meyer, U.A., 2003. Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor activate a drug-responsive enhancer of the murine 5-aminolevulinic acid synthase gene. *J. Biol. Chem.* 278, 39392–39401.
- Glatz, J.F.C., van der Vusse, G., 1996. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog. Lipid Res.* 35, 243–282.
- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., Bernhardt, R., 2007. Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 330–344.
- Katsoyiannis, A., Samara, C., 2007. Ecotoxicological evaluation of the wastewater treatment process of the sewage treatment plant of Thessaloniki. Greece. *J. Hazard. Mater.* 141, 614–621.
- Klein, I., Sarkadi, B., Varadi, A., 1999. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 237–262.
- Kurelec, B., 1992. The Multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 23–43.
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P., 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 216–237.
- Li, X., Chen, X., Li, Q., Wang, L., Zhong, D., 2007. Validated method for rapid inhibition screening of six cytochrome P450 enzymes by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 852, 128–137.
- Medeiros, I.D., Siebert, M.N., Toledo-Silva, G., Moraes, M.O., Marques, M.R.F., Bainy, A.C.D., 2008. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. *Mar. Environ. Res.* 66, 156–157.
- Minier, C., Lelong, C., Djemel, N., Rodet, F., Tutundjian, R., Favrel, P., Mathieu, M., Leboulenger, F., 2002. Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 54, 455–459.
- Peters, L.D., Nasci, C., Livingstone, D.R., 1998. Immunochemical investigations of cytochrome P450 forms/epitopes (CYP1A, 2B, 2E 3A and 4A) in digestive gland of *Mytilus* sp. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 121, 361–369.
- Petrovic, M., Gonzalez, S., Barcelo, D., 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trac Trends Anal. Chem.* 22, 685–696.
- Quinn, B., Gagne, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J., Mothersill, C., 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquat. Toxicol.* 66, 279–292.
- Ravichandran, V., Seres, T., Moriguchi, T., Thomas, J.A., Johnston Jr., R.B., 1994. S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by the phagocytosis-associated respiratory burst in blood monocytes. *J. Biol. Chem.* 269, 25010–25015.
- Rhee, J.S., Lee, Y.M., Hwang, D.S., Lee, K.W., Kim, I.C., Shin, K.H., Raisuddin, S., Lee, J.S., 2007. Molecular cloning and characterization of omega class glutathione S-transferase (GST-O) from the polychaete *Neanthes succinea*: biochemical comparison with theta class glutathione S-transferase (GST-T). *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 146, 471–477.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365–386.
- Saavedra, C., Bachere, E., 2006. Bivalve genomics. *Aquaculture* 256 (1–4), 1–14.
- Schulze, J.O., Schubert, W.D., Moser, J., Jahn, D., Heinz, D.W., 2006. Evolutionary relationship between initial enzymes of tetrapyrrole biosynthesis. *J. Mol. Biol.* 358 (5), 1212–1220.
- Sharma, R., Yang, Y., Sharma, A., Awasthi, S., Awasthi, Y., 2004. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* 6 (2), 289–300.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1–16.
- Shimada, T., 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21, 257–276.
- Smital, T., Kurelec, B., 1997. Inhibitors of the multixenobiotic resistance mechanism in natural waters: in vivo demonstration of their effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2164–2170.
- Smolders, R., De Boeck, G., Blust, R., 2003. Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 890–899.
- Stegeman, J.J., Schlezinger, J.J., Craddock, J.E., Tillitt, D.E., 2001. Cytochrome P450 1A expression in midwater fishes: potential effects of chemical contaminants in remote oceanic zones. *Environ. Sci. Technol.* 35, 54–62.
- Toledo-Silva, G., Siebert, M.N., Medeiros, I.D., Sincero, T., Moraes, M.O., Bainy, A.C.D., 2008. Cloning and sequencing of a new isoform of cytochrome P450 (*CYP356A1*) in oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 66, 15–18.
- Tsiftoglou, A.S., Tsamadou, A.I., Papadopoulos, L.C., 2006. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol. Ther.* 111, 327–345.
- Velkov, T., Chuang, S., Prankerd, R., Sakellaris, H., Porter, C.J., Scanlon, M.J., 2005. An improved method for the purification of rat liver-type fatty acid binding protein from *Escherichia coli*. *Protein Exp. Purif.* 44, 23–31.

## Accepted Manuscript

Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster *Crassostrea gigas*

Guilherme de Toledo-Silva, Marília N. Siebert, Igor D. Medeiros, Thaís C.M. Sincero, Milton O. Moraes, Jared V. Goldstone, Afonso C.D. Bainy

PII: S0141-1136(08)00026-3

DOI: [10.1016/j.marenvres.2008.02.010](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.010)

Reference: MERE 3178

To appear in: *Marine Environmental Research*



Please cite this article as: de Toledo-Silva, G., Siebert, M.N., Medeiros, I.D., Sincero, T.C.M., Moraes, M.O., Goldstone, J.V., Bainy, A.C.D., Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster *Crassostrea gigas*, *Marine Environmental Research* (2008), doi: [10.1016/j.marenvres.2008.02.010](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.010)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

# Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster *Crassostrea gigas*

**Guilherme de Toledo-Silva <sup>a</sup>, Marília N. Siebert <sup>a</sup>, Igor D. Medeiros <sup>a,b</sup>,  
Thaís C.M. Sincero <sup>c</sup>, Milton O. Moraes <sup>d</sup>, Jared V. Goldstone <sup>e</sup>, Afonso  
C.D. Bainy <sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> *Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática, Departamento de Bioquímica, CCB, UFSC,  
Florianópolis, SC, 88040-900, Brasil*

<sup>b</sup> *Laboratório de Ciências Marinhas, Universidade do Sul de Santa Catarina, Av. Colombo Sales, 89,  
Laguna, SC, Brasil, 88790-000*

<sup>c</sup> *Laboratório de Protozoologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, CCB, UFSC, Florianópolis,  
SC, 88040-900, Brazil*

<sup>d</sup> *Laboratório de Hanseníase, Fundação Oswaldo Cruz, Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365,  
21045-900 - Rio de Janeiro, RJ - Brasil*

<sup>e</sup> *Biology Department, Redfield 3-42 MS#32, Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole MA, 02543  
USA*

## Abstract

We have cloned the full-length cDNA of the first member of a new cytochrome P450 (CYP) family from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. This new *CYP* gene was obtained based on an initial 331 bp fragment previously identified among the list of the

differentially expressed genes in oysters exposed to untreated domestic sewage. The full-length *CYP* has an open reading frame of 1500 bp and based on its deduced amino acid sequence was classified as a member of a new subfamily, CYP356A1. A phylogenetic analysis showed that CYP356A1 is closely related to members of the CYP17 and CYP1 subfamilies. Semi-quantitative RT-PCR was performed to analyze the *CYP356A1* expression in different tissues of the oyster (digestive gland, gill, mantle and adductor muscle). Results showed slightly higher *CYP356A1* expression in digestive gland and mantle, than the other tissues, indicating a possible role of the CYP356A1 in xenobiotic biotransformation and/or steroid metabolism.

**Keywords:** Cytochrome P450; Pacific oyster; *Crassostrea gigas*; biotransformation enzymes, CYP356A1, CYP17.

\* Corresponding author: *Email address:* bainy@mbox1.ufsc.br (A.C.D. Bainy)

The cytochromes P450 (CYP) superfamily is one of the largest and functionally most diverse protein families. CYP enzymes are associated with xenobiotic biotransformation and other processes, including homeostasis, hormone biosynthesis and degradation, and oxidative stress (Stegeman and Hahn, 1994). CYP enzymes are the most important oxidative (phase I) biotransformation enzymes in terms of catalytic versatility and breadth of xenobiotic biotransformations carried out (Guengerich, 1987). In this study we cloned the full-length cDNA of a member of a new CYP subfamily from the gill of Pacific oyster *Crassostrea gigas* which has been previously identified in the list of up-regulated genes in oysters exposed to domestic sewage (Medeiros et al., this volume).

An initial fragment of 331 bp was previously identified among the list of the differentially expressed genes in oysters exposed to untreated domestic sewage (Medeiros et al., this volume). Amplification of 5' and 3' cDNA ends were performed by SMART RACE (Clontech), using specific primers (forward 5'-CCAGAAGAATTTGACCCACTTCG-3' and reverse 5'-TTTGTAATCGGACGGAAGCTCTAC-3'). Reactions were set to 25 cycles of: 30 s at 94°C, 30 s at 51°C, and 2 min at 72°C. PCR products were analyzed in 1.2% agarose gel and the 550 bp and 400 bp expected products were purified, cloned and sequenced on ABI3730 (Applied Biosystems). The results were analyzed using BioEdit software. Amplification of the internal region was carried out using the primers, forward 5'-GAAAGGCTCTCAGGCATTATCT-3' and reverse 5'-CCTCTTGACATTTTGCTTGG-3'. Amplification conditions were initial denaturation for 2 min at 94°C, followed by 30 cycles: 30 s at 94°C, 45 s at 47°C, and 60 s at 72°C. PCR product was directly sequenced on MEGABACE 1000 (GE Healthcare). Phylogenetic studies were carried out using Bayesian techniques as implemented in the software MrBayes, which estimates posterior



probabilities using Metropolis-Hastings coupled Monte Carlo Markov chains (MC<sup>3</sup>). Semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was carried out in order to analyze the *CYP* expression in different tissues (digestive gland, gill, mantle and adductor muscle) using the forward and reverse primers (forward: 5'-CCAGAAGAATTTGACCCACTTCG-3', reverse: 5'-TTTGTAATCGGACGGAAGCTCTAC-3'). In order to avoid individual variability, each tissue was pooled from 5 oysters and the total RNA was used for this analysis. The densitometry of products was quantified using Scion Image software.

The full-length sequence of the new *CYP* gene has 1500 bp (Fig. 1, Genbank access no. [ABR45717](#)). The deduced amino acid sequence shows conserved motifs typical of CYP enzymes, such as the heme group binding region, helix-C, helix-I and helix-K motifs (Fig. 1). This sequence was classified by the CYP Nomenclature Committee as a member of a new subfamily, CYP356A1. The phylogenetic analysis demonstrates a close relationship between the CYP356A1 and CYP1 and CYP17 subfamilies (Fig. 2a). CYP356A1 may be classified as an invertebrate CYP Clan 2 (*CYP17*-like) gene, sharing 32-36% amino acid identity (masking out regions of alignment uncertainty) with vertebrate CYP17s. In contrast, CYP356A1 shares a lower percentage identity (30-33%) with CYP1 and CYP2 genes. The CYP17 family is associated with steroid metabolism, while CYP1A is classically used as biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (Hahn, 2002). No *CYP17* genes have been found in non-chordate invertebrates, although *CYP17* is present in amphioxus (Mizuta and Kubokawa, 2007), and *CYP17*-like genes were identified in the genome of the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* (Goldstone et al., 2006). Similarly, *CYP1* and *CYP1*-like genes have been detected in tunicates (CYP1E and

CYP1F subfamilies; Goldstone et al submitted) and sea urchins (Goldstone et al., 2006; 2007), but no *CYP1* sequences have been found in non-deuterostome invertebrates.

Semi-quantitative RT-PCR results showed that higher expression of *CYP356A1* was observed in digestive gland and mantle when compared to gill and adductor muscle (Fig. 2b). The digestive gland and mantle are important tissues for both biotransformation and steroid metabolism.

Considering that the *CYP356A1* has been identified among the list of the up-regulated genes in oysters exposed to untreated domestic sewage (Medeiros et al., this volume), and that this gene was induced by 1.9-fold in oysters exposed to sewage under laboratory conditions (Medeiros et al., submitted) we suggest to test this parameter as a biomarker of exposure in field studies.

### Acknowledgements

This work was supported by CNPq-Universal to ACDB. ACDB is recipient of Productivity Fellowship from CNPq. We are grateful to Dr. David Nelson for gene nomenclature.

## References

- Goldstone, J.V., Hamdoun, A., Cole, B.J., Howard-Ashby, M., Nebert, D.W., Scally, M., et al. (2006) *Developmental Biology*, 300, 366-384.
- Goldstone, J.V., Goldstone, H.M.H., Morrison, A.M., Tarrant, A.M., Kern, S.E., Woodin, B.R., et al. (2007) doi: doi:10.1093/molbev/msm200.
- Guengerich, F.P. (1987) *Mammalian Cytochrome P450*. Boca Raton, FL. CRC Press.
- Hahn ME. (2002) *Science of Total Environment* 289, 49-69.
- Medeiros, I.D., Siebert, M.N., Toledo-Silva, G., Rodrigues, T.B., Marques, M.R.F., and Bainy, A.C.D. Submitted to *Comparative Biochemistry and Physiology*.
- Medeiros, I.D., Siebert, M.N., Toledo-Silva, G., Moraes, M.O., Marques, M.R.F., and Bainy, A.C.D. *Marine Environmental Research*. This issue.
- Mizuta T., and Kubokawa K. (2007). *Endocrinology*. doi:10.1210/en.2007-0109.
- Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., MACKenzie, C., Wilson, J., and Mothersill, C., (2004.) *Aquatic Toxicology*. 66, 279–292.
- Stegeman, J.J., and Hahn, M.E. (1994). *Aquatic Toxicology: molecular, biochemical and cellular perspectives*. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, p. 87-206.

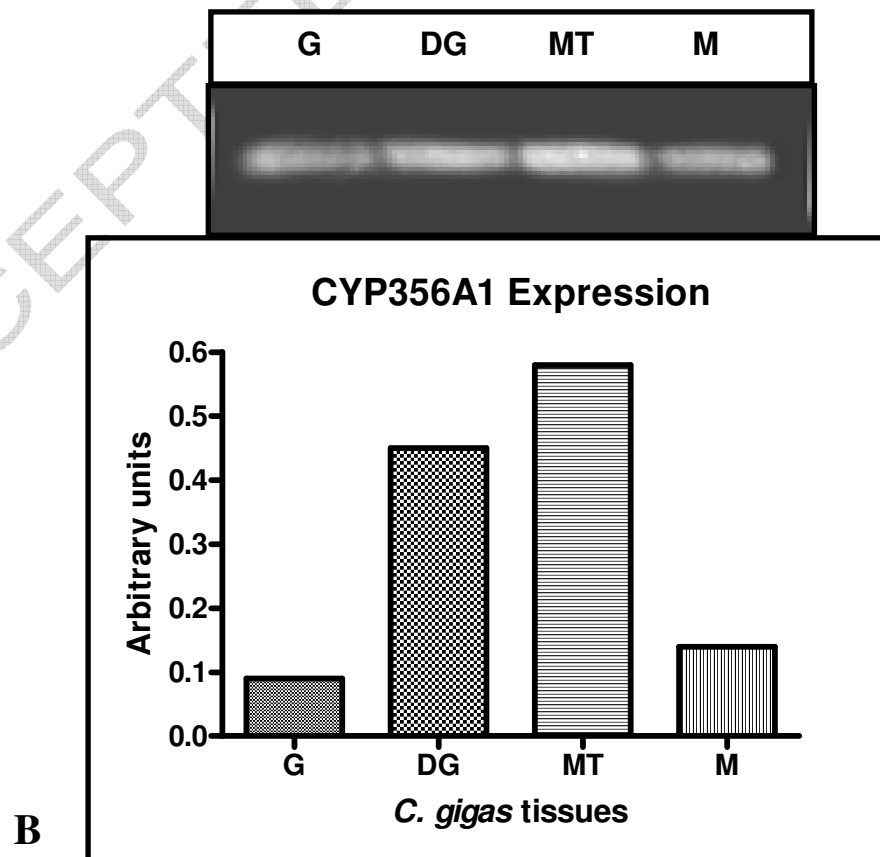
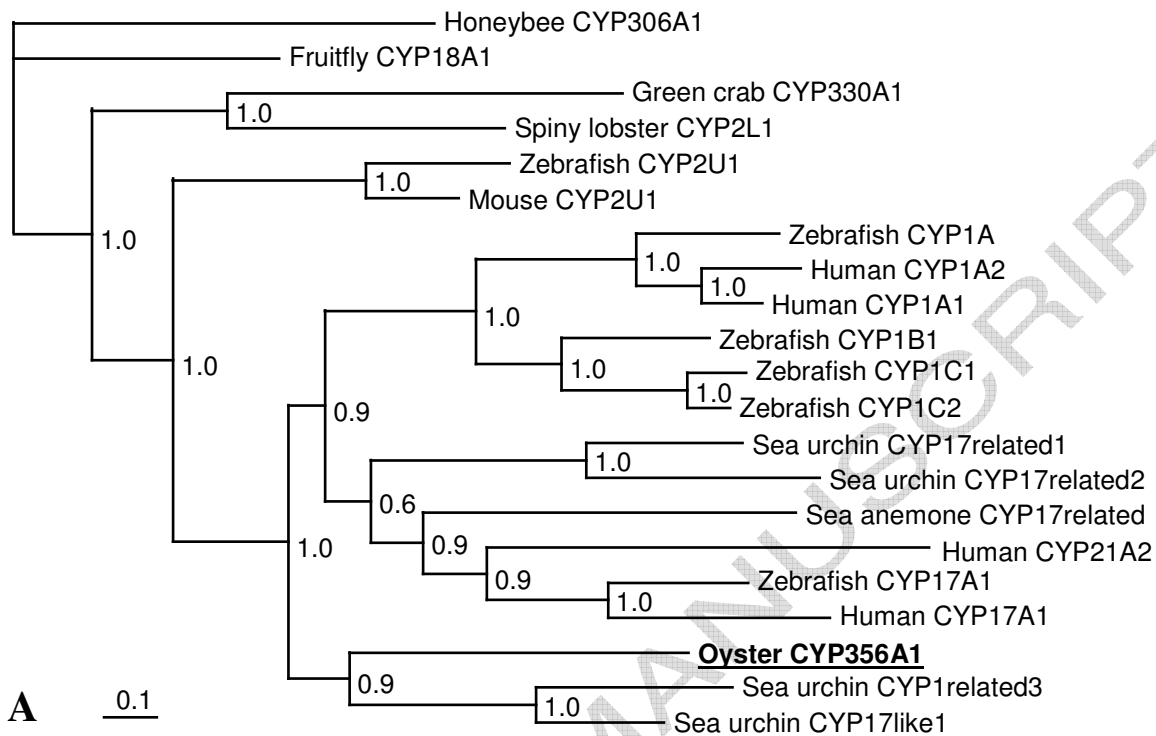
**Figure captions:**

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of CYP356A1 from *Crassostrea rhizophorae*. Some motifs of CYP signatures are indicated, including the C, K, and I helices, and the heme-binding region.

Fig. 2. (A) Phylogenetic relationships using Bayesian techniques. Phylogenetic relationships were estimated with uninformative prior probabilities using the WAG model of amino acid substitution and prior uniform gamma distributions approximated with four categories (WAG+I+G). Four incrementally heated, randomly seeded Markov chains were run for  $3 \times 10^6$  generations, and topologies were sampled every 100th generation. Burnin values were conservatively set at  $1 \times 10^6$  generations. (B) Semi-quantitative RT-PCR and densitometry of CYP356A1 in different tissues of oyster *Crassostrea gigas*. Pool of 5 individuals were used for the analysis in each tissue Legend: G, gill; DG, digestive gland; MT, mantle; M, muscle.

Figure 1

Figure 2



## Accepted Manuscript

Comparison of the antioxidant defense system in *C. rassostrea rhizophorae* and *C. rassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges

Juliano Zanette, Fabrício Flores Nunes, Igor Dias Medeiros, Marília Nardelli Siebert, Jacó Joaquim Mattos, Karim Hahn Lüchmann, Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Afonso Celso Dias Bainy

PII: S0141-1136(08)00086-X

DOI: [10.1016/j.marenvres.2008.02.057](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.057)

Reference: MERE 3232

To appear in: *Marine Environmental Research*



Please cite this article as: Zanette, J., Nunes, c.F., Medeiros, I.D., Siebert, I.N., Mattos, J.J., Lüchmann, K.H., Rodrigues de Melo, u.M., Dias Bainy, A.C., Comparison of the antioxidant defense system in *C. rassostrea rhizophorae* and *C. rassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges, *Marine Environmental Research* (2008), doi: [10.1016/j.marenvres.2008.02.057](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.057)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

**Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges**

**Juliano Zanette <sup>a</sup>, Fabrício Flores Nunes <sup>a,b</sup>, Igor Dias Medeiros <sup>a,c</sup>,  
Marília Nardelli Siebert <sup>a</sup>, Jacó Joaquim Mattos <sup>a</sup>, Karim Hahn  
Lüchmann <sup>a</sup>, Cláudio Manoel Rodrigues de Melo <sup>d</sup>, Afonso Celso Dias  
Bainy <sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup>*Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil*

<sup>b</sup>*Centro Municipal de Educação Ambiental Escola do Mar, São José, Santa Catarina, Brazil*

<sup>c</sup>*Laboratório de Ciências Marinhas, Universidade do Sul de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil*

<sup>d</sup>*Laboratório de Moluscos Marinhos, Universidade Federal de Santa Catarina*

**Abstract**

Oysters *C. rhizophorae* and *C. gigas* were kept for fourteen days at four sites in São José, SC, Brazil, chosen according to a sewage discharge contamination gradient. Enzymatic activities of CAT, GST, G6PDH and GR were evaluated in gills and digestive glands. Higher CAT activity was observed in tissues of *C. rhizophorae* in response to sewage contamination possibly indicating peroxisome proliferation



induction. *C. gigas* showed elevated G6PDH activity in digestive gland, and GR in gills, after domestic sewage exposure. In conclusion, *C. rhizophorae* and *C. gigas* showed different biochemical responses after *in situ* exposure to domestic sewage. However, *C. rhizophorae* showed more significant changes in CAT suggesting that this organism could be a better monitor to this kind of effluent.

**Keywords:** Pollution; Antioxidant defenses; Biomarkers; Oyster; Domestic sewage

\*Corresponding author: Tel: +55-48-37216561 / Fax: +55-48-37219672

E-mail: bainy@mbox1.ufsc.br (A.C.D. Bainy)

Domestic sewage discharges are frequently observed in Brazilian coast, where only 20 % of the cities possess wastewater treatment plant (IBGE, 2000). In the present study, a suite of antioxidant and ancillary enzymes were evaluated in two potential monitor species, the oysters *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas*. *C. rhizophorae* is distributed from Southern Brazil to the Caribbean and the Pacific oyster *C. gigas* is worldwide distributed being the most cultivated oyster in the world. Specimens of *C. rhizophorae* and *C. gigas*, six-months old (2-3 cm and 4-6 cm, respectively) were transplanted from a farming area, in September 2006, to four sites in São José, SC, Brazil, where they were kept for fourteen days. These stations were chosen according to a contamination gradient starting at 0.01, 0.4, 1.5 and 4.5 Km far from the mouth of Bücheler River, the most contaminated site (stations 1, 2, 3 and 4, respectively). Gill and digestive gland from each individual were excised, homogenized, centrifuged and the obtained S9 fraction was prepared to quantify the activity of

catalase (CAT), glutathione *S*-transferase (GST), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and glutathione reductase (GR), as previously described (Carlberg and Mannervik, 1985; Silva et al., 2005). One-way ANOVA, HSD for unequal sample size,  $P<0.05$ , was used to compare the data of stations from each species and tissue, considering the animals from site 4 as the reference group. Fecal coliforms (FC), used as indicator of the presence of domestic sewage discharges were analyzed by multiple-tube fermentation technique according to Standard Methods (1999). The FC average values recorded during the experiment (1, 7 and 14 days) at stations 1, 2, 3 and 4 were 14,100; 1,083; 103; and 46 MPN per 100 ml, evidencing the presence of a gradient of the sewage discharge in the study area. Likewise, the average turbidity and dissolved phosphate levels at the station 1 was about 4 to 10-fold higher than the other sites (data not shown). Correlations between the FC and enzymatic activities of the organisms from each station were performed by Pearson's coefficient ( $P<0.05$ ).

Higher CAT activity was observed in both tissues of *C. rhizophorae* kept at station 1, when compared to the other stations (Figure 1A). Oysters from the station 2 showed higher CAT activity in gills, when compared to the reference site organisms (Figure 1A). Positive correlation between water FC levels and CAT activity was observed in both tissues of *C. rhizophorae*, suggesting a possible association between this enzyme and chemicals discharged in the untreated domestic sewage (Table 1). Elevated CAT activity has been associated with the presence of peroxisome proliferators (PP) in mussel digestive gland (Cancio et al., 1999). CAT activity copes the increase in hydrogen peroxide produced by peroxisomal enzymes (eg.: acyl-CoA oxidases, poly amine oxidase and xanthine oxidase) (Schrader and Fahimi, 2006). In the present study, we could hypothesize that compounds present in the domestic sewage might have induced peroxisome proliferation, with associated increase in the CAT

activity. Zanette et al. (2006) also reported increases in CAT activity in the gills of *C. rhizophorae* sampled at sites contaminated by sewage discharges. Further studies are required to investigate which chemical could be responsible for the increase in CAT activity observed in the present report.

Higher G6PDH activity in the digestive gland of *C. gigas* from station 1 was observed (Figure 1C). The G6PDH is the main regulatory enzyme in the pentose phosphate shunt which produces NADPH, required for the maintenance of the cellular antioxidant capacity, fatty acid biosynthesis, and xenobiotic biotransformation (Silva et al., 2005). NADPH donates electrons to reduce oxidized glutathione (GSSG) through the enzyme glutathione reductase (GR), recycling GSH. Higher GR activity was observed in gills of *C. gigas* from station 1 (Fig. 1D), possibly to compensate a decrease in GSH levels. Lower levels of GSH were found in gills of *C. gigas* from station 1 (data not show). These results suggest that the increase of G6PDH and GR activity in *C. gigas* exposed to domestic sewage occurs in a tissue distinct manner to cope the increase in cellular pro-oxidants and/or depletion of NADPH/GSH employed as substrate by antioxidant and biotransformation enzymes (eg.: GPx and CYP, respectively).

In conclusion, *C. rhizophorae* and *C. gigas* showed different responses in the activity of antioxidant and ancillary enzymes after *in situ* exposure to domestic sewage. However, the native Atlantic southwestern oyster *C. rhizophorae* showed more significant changes in CAT suggesting that this organism is more adequate monitor in this kind of effluent. Further studies need to be carried out to investigate the presence of peroxisome proliferator-inducing compounds in these discharges.

## Acknowledgements

Supported by CNPq-CT-Hidro-CT Agro to ACDB. ACDB is recipient of CNPq productivity fellowship.

## References

- Cancio, I., Ibabe, A., and Cajaraville, M.P. (1999). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 123, 135-144.
- Carlberg, I., and Mannervik B. (1985). Methods in Enzymology, 113, 484-490.
- IBGE. (2000). Atlas Nacional do Brasil. 3<sup>rd</sup> Ed. Rio de Janeiro.
- Schrader, M., and Fahimi, H.D. (2006). Biochimica et Biophysica Acta, 1763, 1755-1766.
- Silva, A.Z., Zanette, J., Ferreira, J.F., Guzenski, J., Marques, M.R.F., and Bainy, A.C.D. (2005). Ecotoxicology and Environmental Safety, 62, 376-382.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater APHA-AWWA-WPCF. (1999). 20<sup>th</sup> Ed.
- Zanette, J., Monserrat, J. M., and Bianchini, A. (2006). Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology, 143, 187-195.

**Figure captions**

Fig. 1. Catalase (CAT), glutathione *S*-transferase (GST), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and glutathione reductase (GR) activities in gills and digestive glands (dg) of *C. gigas* and *C. rhizophorae* (rhiz) oysters from different stations (means  $\pm$  standard deviation). Equal small letters indicate absence of significant differences between stations for each specie/tissue group ( $P>0.05$ ). Equal capital letters indicate absence of significant difference among reference sites (station 4) from different specie/tissue groups ( $P>0.05$ ). Log transformation was employed if normality and homoscedasticity were not verified. The number in parenthesis indicates the number of oysters analyzed in each group.

Figure 1.

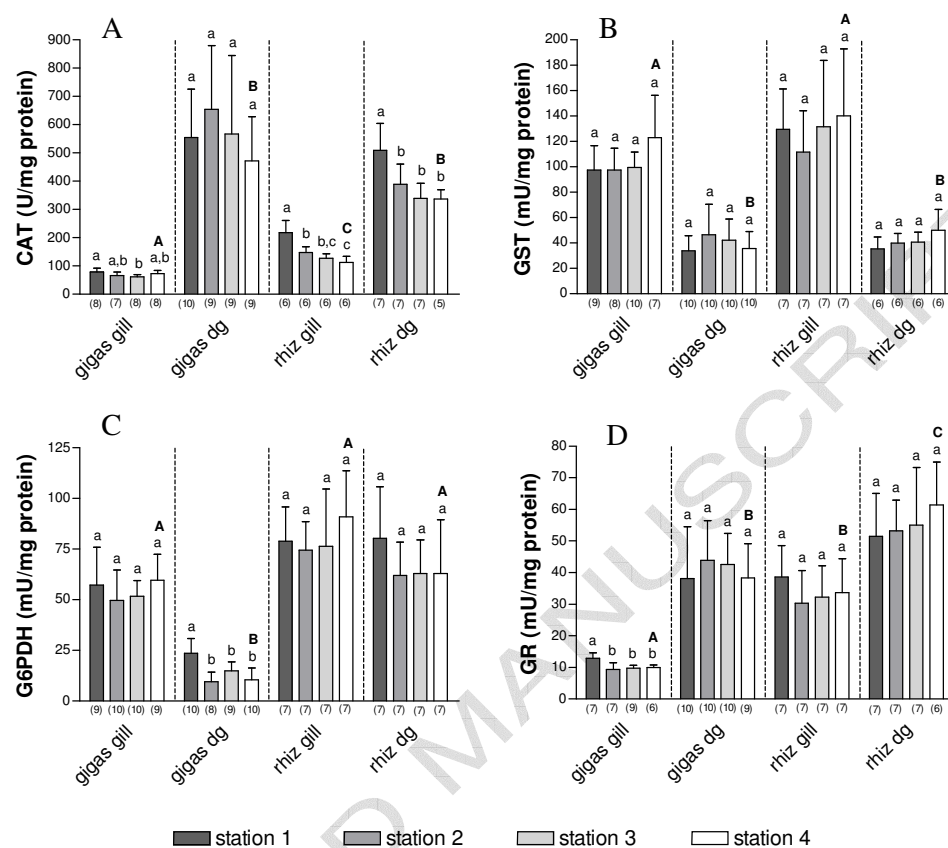


Table 1.

Correlations of faecal coliforms in water (FC) with catalase (CAT), glutathione *S*-transferase (GST), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and glutathione reductase (GR) activities in gills and digestive glands (dg) of *C. gigas* and *C. rhizophorae* oysters transplanted to field stations (Pearson correlation coefficients). \* Indicates significant correlations. Values of FC and enzyme activities were Log transformed.

Oyster	Tissue	Enzyme	fecal coliform correlation coefficient	<i>P</i> -value of correlation
<i>C. gigas</i>	gill	CAT	0.557	0.443
		GST	-0.678	0.322
		G6PDH	0.825	0.175
		GR	-0.860	0.351
	dg	CAT	0.457	0.542
		GST	-0.222	0.778
		G6PDH	-0.056	0.943
		GR	0.759	0.434
<i>C. rhizophorae</i>	gill	CAT	0.981	<b>0.019 *</b>
		GST	-0.436	0.563
		G6PDH	-0.475	0.524
		GR	0.649	0.140
	dg	CAT	0.976	<b>0.023 *</b>
		GST	-0.879	0.120
		G6PDH	-0.475	0.524
		GR	0.565	0.240

## Antioxidant enzymes and thiol/disulfide status in the digestive gland of the brown mussel *Perna perna* exposed to lead and paraquat

Alcir Luiz Dafre<sup>b</sup>, Igor Dias Medeiros<sup>a</sup>, Isabel Cristina Müller<sup>a</sup>,  
Eliana Cristina Ventura<sup>a</sup>, Afonso Celso Dias Bainy<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

Received 6 May 2004; received in revised form 19 July 2004; accepted 19 July 2004

Available online 11 September 2004

### Abstract

Lead (Pb) and paraquat (PQ) have different toxic mechanisms associated with cell damage. Pb may induce alterations in zinc containing proteins, including the known inhibitory effect on the enzyme delta-aminolevulinic acid dehydratase, disrupting the heme-synthesis pathway. During PQ biotransformation, redox cycle reactions enhance oxyradical production, which may lead to pro-oxidative conditions. In this study, we analyzed the effects of Pb and PQ on antioxidant enzymes and thiol status, using the digestive glands of the mussel *Perna perna* collected in a mussel farm on Santa Catarina Island. Mussels were exposed to Pb (1 ppm) and PQ (10 ppm), either separately or concomitantly, for 48 h. We were unable to detect an effect of Pb treatment on the enzymes, catalase, glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GSSG-reductase), which contrasts to the effect of PQ, increasing GSSG-reductase and G6PDH, but decreasing GST activity. The thiol status showed a pro-oxidative trend, observed mainly through a decrease in the reduced/oxidized glutathione ratio, despite the total-glutathione increase. Protein-mixed disulfides and protein thiols did not change by the treatments. The observed effects of PQ and Pb were consistent with literature. Pb had a suppressive effect on the enzymatic changes elicited by PQ, while the changes in the thiol/disulfide parameters were retained.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Paraquat; Lead; Mussel; Glutathione; Oxidative stress; *Perna perna*; Antioxidant enzymes

\* Corresponding author. Tel.: +55 48 331 6561; fax: +55 48 331 9672.

E-mail address: [bainy@mbox1.ufsc.br](mailto:bainy@mbox1.ufsc.br) (A.C.D. Bainy).



## 1. Introduction

Continual exposure to organic compounds triggers biological responses. Among several pathways, detoxification of these xenobiotics to yield biologically inactive compounds ready for excretion is of major importance. Detoxification employs a wide-range of enzymes that are classified in two phases, known as phase I (functional reactions) and phase II (conjugative reactions). Of great importance in phase I metabolism are the oxidative reactions catalyzed by the cytochrome P450-dependent mixed-function oxygenase (MFO) system, which can be induced under exposure to organic xenobiotics for further metabolization [1,2]. Among phase II enzymes, the expression of glutathione *S*-transferase (GST) is a crucial and inducible factor in determining the sensitivity of cells to a broad spectrum of toxic chemicals [3]. GST is part of the repertoire of adaptive response mechanisms to chemical stress widely found in eucariotic cells, from plants to mammals [4,5].

Reactive oxygen species (ROS) production is usually associated with detoxification processes, requiring defence systems to counteract the deleterious effects of the damaging molecules. The major enzymatic defences are superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase (CAT), inactivating superoxide anion and peroxides, respectively. Among the non-enzymatic antioxidants are ascorbic acid, tocopherols and glutathione. Similar to detoxification systems, antioxidant defences can be up-regulated by means of external stimuli. For instance, in a mild oxidative challenge, e.g. low levels of hydrogen peroxide, cell division and protective antioxidant defences are induced without major consequences for cell viability [6,7]. However, under a more severe oxidative impact, cells can be compromised, and several harmful effects become evident [8–10].

The cellular thiol status is of great importance among antioxidant defence systems. In the reducing intracellular milieu, the reduced/oxidized glutathione ratio (GSH/GSSG) is kept on the order of 100/1 or higher [11,12]. To maintain this balance GSSG, is reduced back to GSH by glutathione reductase (GSSG-reductase) at the expense of NADPH, which can be produced during the catalytic cycle of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) [11,13]. An experimental approach to identify whether the cells are

under oxidative stress is to measure GSSG formation and GSH/GSSG ratio [11,12]. Under oxidative challenge, peptide thiols, like glutathione [14], can participate as reducing buffers, leading to a decrease in protein thiols (protein-SH) or an increase in the levels of protein-mixed disulfide (PSSG) formation. Another general response elicited by ROS is the activation of glutathione synthesis that enhances cellular antioxidant capacity [8,12].

The constant discharge of organic contaminants into the aquatic ecosystem imposes the need for assessing the impact of such toxicants on aquatic organisms. In biomonitoring, sessile and widely distributed organisms, such as mussels, are ideal candidates for this purpose and have been used extensively as sentinels in pollution monitoring [15,16]. Bioaccumulation of metal and organochlorines are widely used in monitoring programs [17,18]. However, analysis of biomarkers is considered more appropriate to clarify the toxic effects of a given toxicant. Among the proposed biomarkers for monitoring marine pollution are metallothionein induction, acetylcholinesterase inhibition, cytochrome P450 induction, imposex, lysosomal enlargement and lysosomal membrane destabilization, as well as peroxisome proliferation, while less conclusive results were obtained with antioxidant enzymes as potential biomarkers [16]. Still, a number of laboratory and field studies have found good correlations between the exposure to contaminants and antioxidant parameters [19–24]. One of the major findings is that several antioxidant enzymes change seasonally [23,25], which may be the cause for the lack of consistency in less controlled wide-range surveys. The proper use of antioxidant parameters as biomarkers still requires further laboratory testing and better knowledge of seasonal and natural variations [26,27].

In the environment, mussels are exposed to a wide variety of compounds whose effects can be interrelated. In the present study, we used mussels *Perna perna* to test the effects of 48 h exposure to the classical oxidative stress inducing chemical, paraquat (PQ), and a metal toxicant, lead (Pb). We studied their effects individually or by co-administration. Protective enzymes GST, GSSG-reductase, CAT and G6PDH, as well as, several indicators of disturbance in the thiol/disulfide status, protein thiols, protein-mixed disulfides, total glutathione (GSH-t) and GSSG content were measured.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals and experimental design

Mussels (7–8.5 cm length) were caught during the spring (September) on the “Praia do Sambaqui” and kept in 5 l tanks (seven animals per tank) for acclimatization. To allow the detection of short-term PQ and Pb actions, mussels were exposed for 48 h to low sub-lethal concentrations of PQ 10 ppm [28] and Pb 1 ppm [29]. Mussels were divided into four groups of seven animals each, as follows: (a) unexposed and exposed to (b) PQ 10 ppm (c) Pb 1 ppm and (d) Pb 1 ppm plus PQ 10 ppm (PQ + Pb). Mussels were killed, their digestive glands were dissected and processed essentially as described by Livingstone [30], with slight modifications.

### 2.2. Cytosolic extract

The cytosolic fraction was obtained after centrifugation at  $10,000 \times g$  over 20 min, followed by a second centrifugation of the supernatant at  $38,000 \times g$  over 70 min. The supernatant was taken as the cytosolic fraction.

### 2.3. Enzymatic measurements

The cytosolic fraction was assayed for the activity of catalase through hydrogen peroxide decomposition monitored at 240 nm, using a molar extinction coefficient of  $0.04 \text{ M cm}^{-1}$  [31]. Glucose 6-phosphate dehydrogenase was quantified through the increase in absorbance at 340 nm associated with the rate of NADPH formation reduction elicited by the enzyme [32]. GST was measured using 1-chloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB), which is a substrate used by several GST isoforms [33] and, finally, GSSG-reductase [34] was analyzed using the NADPH oxidation rate at 340 nm.

### 2.4. Thiol-disulfide status

In a second experiment set, total glutathione (GSH-t), oxidized glutathione (GSSG), protein-mixed disulfides of glutathione, also known as *S*-thiolation (PSSG), and total protein thiols (protein-SH) were measured.

### 2.5. Tietze recycling assay for glutathione

This method takes advantage of the glutathione reductase activity to convert GSSG (glutathione disulfide or oxidized) to the reduced form GSH. GSH, in turn, reacts with a symmetric disulfide, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), releasing the GSH-TNB disulfide and the color forming thiol 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB). GSSG-reductase reduces GSH-TNB to GSH, releasing the second TNB, thus increasing the color development and making GSH free to react again with DTNB and re-enter the cycle [35]. The method was used as modified by Akerboom and Sies [36].

### 2.6. Total-glutathione (GSH-t)

The digestive gland was homogenized in 0.5 M perchloric acid, followed by centrifugation at  $15,000 \times g$  over 2 min and neutralized to pH 6–7. The clear supernatant was assayed for GSH-t by using the Tietze recycling assay, and the sum of reduced glutathione and GSSG, measured as modified by Akerboom and Sies [36].

### 2.7. Glutathione disulfide or oxidized (GSSG)

GSH usually is found as the major form, more than 99%, and is easily converted into GSSG during sample procedures. Samples were handled on ice. Fresh tissue extract prepared in potassium phosphate 25 mM, pH 7.0, was incubated with 6 mM *N*-ethylmaleimide to inactivate GSH, and acid extracted with 0.5 M perchloric acid. After centrifugation the supernatant was brought to pH 11 to eliminate excess *N*-ethylmaleimide and neutralized to pH 6–7. The neutralized sample was assayed by Tietze recycling assay. Internal standards were used to assess the accuracy of measurement [37].

### 2.8. Protein-mixed disulfide with glutathione or *S*-thiolation (PSSG)

Protein-mixed disulfide with glutathione, also known as *S*-thiolation, was measured in the GSH-t sample pellet. The pellet was washed three times with 1.5% trichloroacetic acid, to remove low molecular weight thiols, and neutralized with 0.5 M phosphate buffer to pH 7.4. The glutathione bound to proteins

was released by addition of 1% sodium borohydride. The borohydride-reduced protein was precipitated with 0.5 M perchloric acid. After centrifugation at  $15,000 \times g$  over 5 min, the supernatant was collected, neutralized to pH 6–7 and assayed by the Tietze recycling assay, as described [38].

## 2.9. Protein thiols (protein-SH)

Protein thiol was measured colorimetrically using Ellman's reagent, DTNB–5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) [39]. An aliquot of the neutralized pellet used for PSSG was incubated for 30 min at room temperature in the presence of 0.15 mM DTNB, centrifuged at  $15,000 g$  over 5 min and the absorbance read at 412 nm. A sample blank without Ellman's reagent was run in parallel and subtracted from total absorbance.

## 2.10. Protein and data analysis

For protein quantification bovine serum albumin was used as a standard [40]. Data was compared using one-way ANOVA, followed by Newman–Keuls as post hoc test, adopting  $P < 0.05$ .

## 3. Results

Mussels exposed to PQ for 48 h at 10 ppm showed higher GSSG-reductase and G6PDH activity ( $P < 0.05$ ), while GST activity was lower when compared to the control group. No significant changes in enzymatic activity were observed, in the mussels exposed to Pb (Fig. 1A–D). CAT activity remained unchanged in all experimental groups (Fig. 1D).

The alterations in the enzyme activity caused by PQ were no longer seen when PQ was tested in co-administration with Pb. It may be seen as a dampening effect on the response induced by PQ, although no further investigation was carried out to search for mechanisms of Pb action on the response elicited by PQ.

All treatments triggered a significant increase in the GSH-t levels in the digestive gland of *P. perna* (Fig. 2A). PQ caused an increase in the GSH-t level, although to a lesser extent than obtained by Pb (Fig. 2A). When Pb was co-administered with PQ, the Pb effect

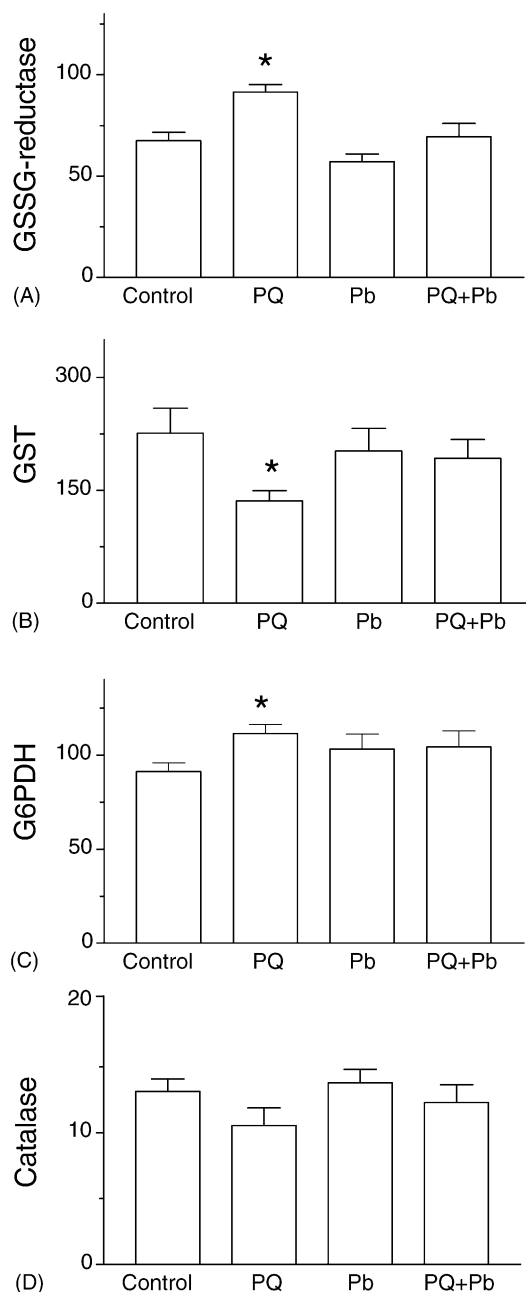


Fig. 1. Antioxidant enzyme activity in the digestive gland of the mussel *Perna perna* exposed to lead and paraquat. Mussels were unexposed (control) or exposed for 48 h to paraquat 10 ppm (PQ), lead 1 ppm (Pb), and paraquat 10 ppm plus lead 1 ppm (PQ + Pb). (A) glutathione reductase (B) glutathione *S*-transferase; (C) glucose 6-phosphate dehydrogenase and (D) catalase. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M.;  $N = 7$ , and the enzymatic activity as mU/mg of protein; \*: significant differences from the control group at  $P < 0.05$ .

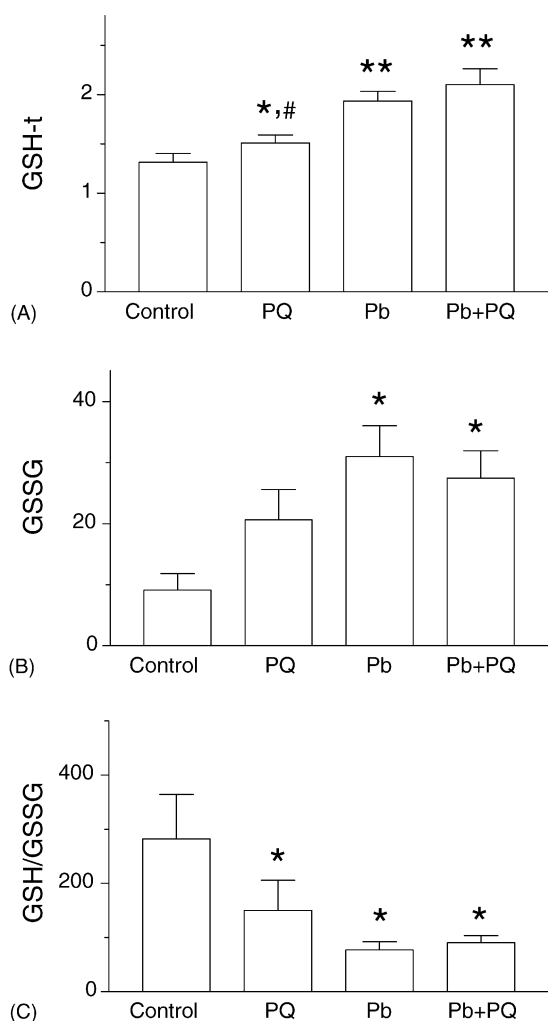


Fig. 2. Glutathione in the digestive gland of the mussel *Perna perna* exposed to lead and paraquat. (A) total glutathione (GSH-t) (values are expressed in  $\mu\text{mol/g}$  of wet tissue); (B) glutathione disulfide (GSSG)—values are expressed in  $\text{nmol/g}$  of wet tissue; (C) GSH-t/GSSG ratio. Other details as described in Fig. 1. Significant differences from the control group are indicated as  $P < 0.01$  (\*\*) or  $P < 0.05$  (\*); #: significant differences from the Pb ( $P < 0.05$ ) or PQ + Pb ( $P < 0.01$ ) groups.

was prevalent, indicating it as a major contributor in the response.

The profile observed for GSH-t was the same as that observed for GSSG (Fig. 2B). The PQ-induced increase in GSSG levels was close to statistical significance ( $P < 0.1$ ). The changes caused by PQ was confirmed when the ratio GSH/GSSG was obtained from the data pre-

Table 1

Protein-SH and S-thiolation (PSSG) in the digestive gland of the *Perna perna* mussel exposed to lead and paraquat for 48 h

Treatment <sup>a</sup>	Protein-SH	PSSG
Control <sup>b</sup>	$3.68 \pm 0.31$ (3)	$22.7 \pm 2.15$ (7)
Paraquat (10 ppm)	$4.12 \pm 0.35$ (3)	$26.8 \pm 1.92$ (5)
Lead (1 ppm)	$4.34 \pm 0.40$ (4)	$26.0 \pm 3.09$ (5)
Paraquat (10 ppm) + Lead (1 ppm)	$3.94 \pm 0.13$ (4)	$24.9 \pm 2.00$ (7)

<sup>a</sup> No significant difference to controls was found at  $P < 0.05$ .

<sup>b</sup> Data are mean  $\pm$  S.E.M. (N) and expressed as  $\mu\text{mol}$  (protein-SH) or  $\text{nmol}$  (PSSG)/g of wet tissues.

sented in Fig. 2A and B (Fig. 2C). In this case, PQ induced a significant decrease in the GSH/GSSG ratio, suggesting a pro-oxidative state.

Pb or PQ plus Pb treatment produced a significant increase in the GSSG as well as a decrease in the GSH/GSSG ratio, revealing an oxidative state (Fig. 2B and C). We could suggest that in the PQ + Pb treatment, Pb was the major causative agent, once it induced the same response in the GSH-t, GSSG or GSH/GSSG levels, regardless of the presence of PQ.

The absence of changes in the levels of protein-mixed disulfides and protein thiols (Table 1) indicates that these parameters are not sensitive enough to be used as markers of oxidative stress in mussels under mild oxidative challenge as used in this study.

## 4. Discussion

### 4.1. Paraquat-induced effects on enzyme

Environmental pollutants such as metallic and organic xenobiotics have cytotoxic effects on aquatic organisms, some of them known to give rise to ROS, thereby causing oxidative damage to tissue macromolecules including DNA, proteins, and lipids [41–43]. PQ is a known redox cycling agent that induces ROS production, imposing a pro-oxidative state on cells and tissues [44]. Mussel hemocytes produce ROS after PQ treatment [45]. Lipid peroxidation was observed after PQ treatment in mussel [41]. PQ will alter physiologic parameters in mussels, such as the circadian activity related to the monoaminergic system [46] and the gill metabolic activity [47]. In both studies, biphasic behavior was observed. The mechanism of PQ toxicity involves the generation of the superoxide anion

[41–43,48], which can lead to the formation of more toxic reactive oxygen species, and the oxidation of the cellular NADPH, the major source of reducing equivalents to the intracellular reduction of PQ, which results in the disruption of important NADPH-requiring biochemical processes [9]. NADPH depletion increases the metabolism through the pentose–phosphate shunt in rainbow trout, which may be the underlying cause for an induction of liver GSSG-reductase and G6PDH [49]. Similarly, in another study carried out on the same species, PQ strongly induced the GSSG-reductase activity; GST showed a moderate increase, while GPx activity decreased [50]. A clear increase in the levels of G6PDH and GSSG-reductase was observed in *Sparus aurata* [43]. Fig. 1A and C show an increase in GSSG-reductase and G6PDH activities, respectively, in the digestive gland of mussels exposed to PQ (10 ppm for 48 h). This response indicates that PQ has a similar effect in mussels, fish and mammals whose response suggests an increase in pentose shunt enzymes, which could be taken as a compensatory response to NADPH oxidation [9,51]. As stated above, one feature of PQ treatment in fish is the strong induction of GSSG-reductase [43,49,50], although an increase of GSH-t was observed [50]. As well, an increase in GSH-t levels was also shown in the *Modiolus demissus* mussel exposed to PQ [41], and the same effect was observed for *Perna perna* (Fig. 2A). The NADPH consumption imposed by PQ probably leads to an increase in G6PDH, while the oxidative stress caused by PQ up-regulates antioxidant through an increase in GSSG-reductase activity and GSH-t content, and indirectly through the increase in G6PDH activity, which has been shown to be an integral part of the antioxidant defence system [52,53].

No changes were observed in the activity of the other antioxidant enzyme measured, i.e. CAT (Fig. 1D). However, a transient and dose dependent increase in CAT levels was observed in the *Modiolus demissus* mussel [41]. Similarly, no changes were produced by PQ treatment on CAT and glutathione peroxidase activity observed in rainbow trout, while the observed decrease in GST activity (Fig. 1B) was opposite to what has been found in trout [50]. The freshwater bivalve *Unio* sp. showed no changes in GST activity, when exposed to PQ for 3 days, but the MFO activity was disturbed by PQ without a consistent pattern of change. An absence of DNA damage in PQ-treated *Sparus au-*

*rata* fish was also observed [43]. Likewise, an increase in superoxide dismutase activity was clearly observed in mussels treated with PQ [41]. These data demonstrate the need of more studies on these antioxidant enzymes to better identify the responses elicited by PQ on aquatic organisms.

On the basis of the oxidative parameters measured in PQ treated animals, no changes were observed in the protein-mixed disulfide and protein thiols (Table 1) or levels of GSSG. However, a significant reduction in the GSH/GSSG ratio was observed (Fig. 2C), which is a classical marker of oxidative perturbations [11,12]. In fact, in a case of oxidative damage induced by an organophosphorus compound in eel, the hepatic GSH/GSSG ratio was the best predictable variable related to survival. Furthermore, *N*-acetylcysteine supplementation, which increases hepatic glutathione, leads to a higher survival rates in the case of lethal concentrations of dichlorvos [54,55]. In our case, although the changes were not so strong, they indicate a pro-oxidative status in the digestive glands of PQ-treated mussels.

#### 4.2. Lead elicited changes in the thiol/disulfide status

Under exposure, mussels accumulate metals in different body parts to different extents [56–58]. Such bioaccumulation generates several physiological responses, e.g., laboratory or environmental exposure to Pb produce alterations in the filtration and assimilation rates [59], changes in stress protein expression [60], alterations in allozyme and polymorphic loci frequencies [61] and reduction of immune activity [62].

Thiol chelating agents in association to antioxidants can be used in Pb poisoning [63–66], which is justified by the oxidative stress induced by Pb and the high affinity of Pb towards thiol groups. Antioxidants, like G6PDH and GSSG-reductase are possible targets for Pb-mediated inhibition [63]. However, this inhibition was not observed in mussels exposed for 48 h to Pb (Fig. 1), which may be related to the low concentration and short-term exposure period used.

Pb also disturbs the cellular thiol status of the cell, binding to thiol groups with high affinity, and decreasing GSH/GSSG ratio [64,66]. The effective increase in the glutathione content in the gills and digestive gland of the green mussel *Perna viridis* after 2–3 weeks of



exposure to Pb is of particular interest [67]. In our experiment, Pb was capable of inducing an increase in GSH-t after 48 h of exposure (Fig. 2A), showing that the increase in GSH-t is a reproducible response in mussels exposed to Pb in the laboratory. GSSG levels were elevated by Pb treatment (Fig. 2B), and despite the increase in GSH-t, the GSH/GSSG ratio was reduced (Fig. 2C). We suggest that the elevation in GSH-t in mussels exposed to 1 ppm of Pb over 48 h might be a response to oxidative stress, since a concomitant increase in the GSSG and decrease in the GSH/GSSG ratio was observed, these being good indicators of oxidative damage [11,12]. Lead is known to cause oxidative damage in mammals [10], and similar effects have been found in mussel [68], which shows that GSH-t and GSSG are good indices of oxidative damage in mussels, in line with the finding that GSH/GSSG is the best predictive variable of oxidative damage caused by an organophosphorus compound [55].

#### 4.3. Lead-paraquat interaction

The effect of Pb prevailed over PQ in mussels simultaneously exposed to Pb plus PQ. This effect was observed in all tested variables in which the effect of PQ differed from that of Pb. This effect prompted us to suggest that Pb blunted the antioxidant enzyme changes produced by PQ treatment (GSSG-reductase, GST, G6PDH), while the increase in GSH-t and GSSG caused by Pb was retained. A plausible mechanism for the Pb-dependent blockage in the antioxidant response induced by PQ is the ability of Pb to bind to zinc binding domains, which can disrupt the DNA-binding activity of transcription factors and other sensitive proteins, like delta-aminolevulinic acid dehydratase (delta-ALAD) [69].

### 5. Final comments

The mussel response to PQ, i.e. increase in the levels of GSH-t, G6PDH and GSSG-reductase was consistent and in line with previous work on mussels and fish, in which an induction in the pentose phosphate pathway is suggested, in addition to the known oxidative effect of PQ [41,49,50]. The higher activity of G6PDH could counteract PQ-induced NADPH consumption, which may sustain the increase in GSSG-reductase activity.

However, the decrease in the GSH/GSSG ratio and the increase in the GSH-t levels, the latter being a possible response to oxidative stress, suggest that these organisms are facing a pro-oxidant condition associated with PQ exposure. We could also propose that mussels experience an activation of glutathione synthesis as a protective measure to counteract the known oxidative effect of Pb, also suggested by the increase in GSSG and by a decrease in the GSH/GSSG ratio. When mussels are simultaneously exposed to PQ and Pb, the Pb effect of increasing GSH-t and GSSG, resulting in a lowering in the GSH/GSSG ratio, was maintained, while Pb blunted the PQ effect in the induction of antioxidant enzymes.

### Acknowledgements

This work was supported by CIAMB-PADCT III and Plano Sul de Pesquisa e Pós-Graduação-CNPq and in part by International Foundation for Science-IFS (IFS Research Grant Agreement Number A/2845-1); CAPES (fellowships to I.D.M., I.C.M. and E.C.V.) and CNPq (productivity fellowship to A.C.D.B.). We would like to acknowledge Dr. Jaime Fernando Ferreira for supplying the mussels used in this study.

### References

- [1] D.R. Livingstone, Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in invertebrates, *Biochem. Soc. Trans.* 18 (1990) 15–19.
- [2] C. Porte, X. Biosca, M. Sole, J. Albaiges, The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain), *Environ. Pollut.* 112 (2001) 261–268.
- [3] B.K. Gadagbui, M.O. James, Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine, *Aquatic Toxicol.* 49 (2000) 27–37.
- [4] Y.K. Sharma, K.R. Davis, Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.* 105 (1994) 1089–1096.
- [5] H. Norppa, Genetic susceptibility, biomarker responses and cancer, *Mutat. Res.* 544 (2003) 339–348.
- [6] J.R. Stone, T. Collins, The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses, *Endothelium* 9 (2002) 231–238.
- [7] V. Costa, P. Moradas-Ferreira, Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases, *Mol. Aspects Med.* 22 (2001) 217–246.
- [8] D.A. Dickinson, H.J. Forman, Cellular glutathione and thiols metabolism, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 1019–1026.

- [9] Z.E. Suntres, Role of antioxidants in paraquat toxicity, *Toxicology* 180 (2002) 65–77.
- [10] P.C. Hsu, Y.L. Guo, Antioxidant nutrients and lead toxicity, *Toxicology* 180 (2002) 33–44.
- [11] F.Q. Schafer, G.R. Buettner, Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001) 1191–1212.
- [12] G. Filomeni, G. Rotilio, M.R. Ciriolo, Cell signalling and the glutathione redox system, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 1057–1064.
- [13] R.F. Kletzien, P.K. Harris, L.A. Foellmi, Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress, *FASEB J.* 8 (1994) 174–181.
- [14] J.A. Thomas, B. Poland, R. Honzato, Protein sulfidryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation, *Arch. Biochem. Biophys.* 319 (1995) 1–9.
- [15] D. Sheehan, J. McIntosh, A. Power, P.J. Fitzpatrick, Drug metabolizing enzymes of mussels as bioindicators of chemical pollution, *Biochem. Soc. Trans.* 23 (1995) 419–422.
- [16] M.P. Cajaraville, M.J. Bebianno, J. Blasco, C. Porte, C. Sarasquete, A. Viarengo, The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach, *Sci. Total Environ.* 247 (2000) 295–311.
- [17] G. Blackmore, W.X. Wang, Comparison of metal accumulation in mussels at different local and global scales, *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (2003) 388–395.
- [18] I. Monirith, D. Ueno, S. Takahashi, H. Nakata, A. Sudaryanto, A. Subramanian, S. Karuppiyah, A. Ismail, M. Muchtar, J. Zheng, B.J. Richardson, M. Prudente, N.D. Hue, T.S. Tana, A.V. Tkalin, S. Tanabe, Asia-Pacific mussel watch: monitoring contamination of persistent organochlorine compounds in coastal waters of Asian countries, *Mar. Pollut. Bull.* 46 (2003) 281–300.
- [19] M.A. Torres, C.P. Testa, C. Gaspari, M.B. Masutti, C.M. Panitz, R. Curi-Pedrosa, E.A. de Almeida, P. Di Mascio, D.W. Filho, Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil, *Mar. Pollut. Bull.* 44 (2002) 923–932.
- [20] M.G. Lionetto, R. Caricato, M.E. Giordano, M.F. Pascariello, L. Marinosci, T. Schettino, Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area, *Mar. Pollut. Bull.* 46 (2003) 324–330.
- [21] L. Ferrat, C. Pergent-Martini, C. Fernandez, M. Romeo, Is glutathione transferase (GST) activity in *Posidonia oceanica* a stress response to mercury exposure? *Bull. Mar. Sci.* 71 (2002) 1183–1190.
- [22] B.T.G. Gowland, A.D. McIntosh, I.M. Davies, C.F. Moffat, L. Webster, Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels, *Mar. Environ. Res.* 54 (2002) 231–235.
- [23] S. Niyogi, S. Biswas, S. Sarker, A.G. Datta, Antioxidant enzymes in brackish water oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences, *Sci. Total Environ.* 281 (2001) 237–246.
- [24] C.C.C. Cheung, G.J. Zheng, A.M.Y. Li, B.J. Richardson, P.K.S. Lam, Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*, *Aquat. Toxicol.* 52 (2001) 189–203.
- [25] D. Wilhelm-Filho, T. Tribess, C. Gaspari, F.D. Claudio, M.A. Torres, A.R. Magalhães, Seasonal changes in antioxidant defences of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*), *Aquaculture* 203 (2001) 149–158.
- [26] A. Viarengo, L. Canesi, M. Pertica, D.R. Livingstone, Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels, *Comp. Biochem. Physiol. C.* 100 (1991) 187M–190M.
- [27] M. Sole, C. Porte, J. Albaigés, The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels, *Sci. Total Environ.* 159 (1995) 147–153.
- [28] R.J. Wenning, R.T. Di Giulio, The effects of paraquat on microsomal oxygen reduction and antioxidant defences in ribbed mussels (*Geukensia demissa*) and wedge clams (*Rangia cuneata*), *Mar. Environ. Res.* 24 (1988) 301–305.
- [29] C.K. Yap, A. Ismail, H. Omar, S.G. Tan, Toxicities and tolerances of Cd, Cu, Pb and Zn in a primary producer (*Isochrysis galbana*) and in a primary consumer (*Perna viridis*), *Environ. Int.* 29 (2004) 1097–1104.
- [30] D.R. Livingstone, Responses of microsomal NADPH-cytochrome-C reductase-activity and cytochrome P-450 in digestive glands of *Mytilus edulis* and *Littorina littorea* to environmental and experimental exposure to pollutants, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46 (1988) 37–43.
- [31] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–125.
- [32] G.E. Glock, R.O. McLean, Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver, *Biochem. J.* 55 (1953) 400–408.
- [33] W.H. Habig, W.B. Jakoby, Glutathione S-transferase (rat and human), *Methods Enzymol.* 77 (1981) 218–231.
- [34] I. Carlberg, B. Mannervik, Glutathione reductase, *Methods Enzymol.* 113 (1985) 484–489.
- [35] P. Eyer, D. Podhradsky, Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman’s reagent, *Anal. Biochem.* 153 (1986) 57–66.
- [36] T.P.M. Akerboom, H. Sies, Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples, *Meth. Enzymol.* 77 (1981) 373–382.
- [37] P. Sacchetta, D. Di Cola, G. Federici, Alkaline hydrolysis of N-ethylmaleimide allows a rapid assay of glutathione disulfide in biological samples, *Anal. Biochem.* 154 (1986) 205–208.
- [38] R. Brigelius, C. Muckel, T.P.M. Akerboom, H. Sies, Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide, *Biochem. Pharmacol.* 32 (1983) 2529–2534.
- [39] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70–77.

- [40] G.L. Peterson, A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, *Anal. Biochem.* 83 (1977) 346–356.
- [41] R.J. Wenning, R.T. Di Giulio, E.P. Gallagher, Oxidant-mediated biochemical effects of paraquat in the ribbed mussel, *Geukensia demissa*, *Aquatic. Toxicol.* 12 (1988) 157–170.
- [42] J.R. Pedrajas, J. Peinado, J. Lopez-Barea, Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu, Zn-superoxide dismutase as potential Biomarkers, *Chem. Biol. Interact.* 98 (1995) 267–282.
- [43] A. Rodriguez-Ariza, J. Alhama, F.M. Diaz-Mendez, J. Lopez-Barea, Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of Sparus aurata fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution, *Mutat. Res.* 438 (1999) 97–107.
- [44] M. Comporti, Three models of free radical-induced cell injury, *Chem. Biol. Interact.* 72 (1989) 1–56.
- [45] A. Gomez-Mendikute, M.P. Cajaraville, Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes, *Toxicol In Vitro* 17 (2003) 539–546.
- [46] J. Nemcsók, L. Hiripi, M. Patocskaí, J. Salanki, O. Kufcsak, The effects of pesticides on monoaminergic system related to periodic activity of mussels (*Anodonta cygnea* L.), *Gen. Pharmacol.* 29 (1997) 79–83.
- [47] M.A. Cheney, R. Fiorillo, R.S. Criddle, Herbicide and estrogen effects on the metabolic activity of *Elliptio complanata* measured by calorimetry, *Comp. Biochem. Physiol. C* 118 (1997) 159–164.
- [48] B.J. Day, M. Patel, L. Calavetta, L.Y. Chang, J.S. Stamler, A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 (1999) 12760–12765.
- [49] G. Akerman, P. Amcoff, U. Tjarnlund, K. Fogelberg, O. Torrisen, L. Balk, Paraquat and menadione exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)-Studies of effects on the pentose-phosphate shunt and thiamine levels in liver and kidney, *Chem. Biol. Interact.* 142 (2003) 269–283.
- [50] E. Stephensen, J. Sturve, L. Forlin, Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver, *Comp. Biochem. Physiol. C* 133 (2002) 435–442.
- [51] J.S. Bus, J.E. Gibson, Paraquat model for oxidant initiated toxicity, *Environ. Health Perspect* 55 (1984) 37–46.
- [52] H. Juhnke, B. Krems, P. Kotter, K.D. Entian, Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress, *Mol. Gen. Genet.* 252 (1996) 456–464.
- [53] J.A. Leopold, J. Loscalzo, Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PDH expression in smooth muscle cells, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 279 (2000) H2477–H2485.
- [54] S. Peña-Llopis, M.D. Ferrando, J.B. Pena, Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by *N*-acetylcysteine, *Aquat. Toxicol.* 65 (2003) 337–360.
- [55] S. Peña-Llopis, M.D. Ferrando, J.B. Pena, Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves, *Chemosphere* 47 (2002) 485–497.
- [56] C.K. Yap, A. Ismail, S.G. Tan, Can the byssus of green-lipped mussel *Perna viridis* (Linnaeus) from the west coast of Peninsular Malaysia be a biomonitoring organ for Cd, Pb and Zn? Field and laboratory studies, *Environ. Int.* 29 (2003) 521–528.
- [57] V.K. Dimitriadis, G.P. Domouhtsidou, E. Raftopoulou, Localization of Hg and Pb in the palps, the digestive gland and the gills in *Mytilus galloprovincialis* (L.) using autometallography and X-ray microanalysis, *Environ. Pollut.* 125 (2003) 345–353.
- [58] C. Gundacker, Tissue-specific heavy metal (Cd, Pb, Cu, Zn) deposition in a natural population of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* Pallas, *Chemosphere* 38 (1999) 3339–3356.
- [59] M.L. Pessatti, J.C. Resgalla, F.R. Reis, J. Kuehn, L.C. Salomao, J.D. Fontana, Variability of filtration and food assimilation rates, respiratory activity and multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in the mussel *Perna perna* under lead influence, *Braz. J. Biol.* 62 (2002) 651–656.
- [60] M. Radlowska, J. Pempkowiak, Stress-70 as indicator of heavy metals accumulation in blue mussel *Mytilus edulis*, *Environ. Int.* 27 (2002) 605–608.
- [61] C.K. Yap, S.G. Tan, A. Ismail, H. Omar, Allozyme polymorphisms and heavy metal levels in the green-lipped mussel *Perna viridis* (Linnaeus) collected from contaminated and uncontaminated sites in Malaysia, *Environ. Int.* 30 (2004) 39–46.
- [62] F.E. Nieto-Fernandez, K. Alcide, C. Rialas, Heavy metals and neuroimmunomodulation in *Mytilus edulis*, *Acta Biol. Hung.* 51 (2000) (ANO) 325–329.
- [63] H. Gurer, N. Ercal, Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Rad. Biol. Med.* 29 (2000) 927–945.
- [64] S.K. Tandon, S. Singh, S. Prasad, S. Srivastava, M.K.J. Siddiqui, Reversal of lead-induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant, or their combination in the rat, *Environ. Res. A* 90 (2002) 61–66.
- [65] S.J.S. Flora, M. Pande, A. Mehta, Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication, *Chem-Biol. Interact.* 145 (2003) 267–280.
- [66] H. Gurer-Orhan, H.U. Sabýr, H. Özgüne, Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers, *Toxicology* 195 (2004) 147–154.
- [67] T. Yan, L.H. Teo, Y.M. Sin, Effects of mercury and lead on tissue glutathione of the green mussel, *Perna viridis* L., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58 (1997) 845–850.
- [68] N.T. Prakash, K.S. Rao, Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure, *Mol. Cell. Biochem.* 146 (1995) 107–113.
- [69] H.A. Godwin, The biological chemistry of lead, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 223–227.